مقاله پژوهشی

مقایسه اثرات داروی اگزالی پلاتین بر میزان نیتریک اکساید در رده سلولی سرطانی کولورکتال SW480 و غیرسرطانی HEK293

سید ایوب احمدی[۱]، طاهره ناجی[۱*]، رحیم احمدی[۲]

۱- گروه داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

* مسئول مکاتبات: tnaji2002@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۸

DOI: 10.22034/ascij.2023.1990060.1508

چکیده

سرطان روده بزرگ یکی از شایع‌ترین تومورها در جمعیت انسانی است. داروهای زیادی جهت درمان انواع مختلف سرطان در بازار موجود می‌باشد ولی به علت اثرات سمی و تاثیرات جانبی استفاده از آنها محدود شده است و در دهه اخیر متخصصین این حوزه بدنبال جایگزین مناسب برای داروهای ضد سرطانی رایج می باشند. هدف از این مطالعه ارزیابی مقایسه اثرات داروی اگزالی پلاتین بر میزان نیتریک اکساید در رده سلولی سرطانی کولورکتال SW480 و غیر سرطانی HEK293 انجام شده است. در این مطالعه تجربی، اگزالی پلاتین در غلظت‌های ۱/۹۵، ۳/۹، ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر تهیه شد و اثر سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های SW480 و HEK293 با استفاده از روش MTT بررسی شد. اکسید نیتریک با استفاده از روش Griess اندازه‌گیری شد و از روش Real Time PCR برای ارزیابی بیان ژن iNOS استفاده شد. در نهایت، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون t برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اگزالی پلاتین در غلظت‌های ۷/۸ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر روی سلول‌های SW480 اثر کشنده‌ای بر روی سلول دارد اما دربقیه غلظت‌ها هیچ اثر سمیت سلولی بر روی رده‌ی سلولی طبیعی نشان نداد. اگزالی پلاتین در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تولید اکسید نیتریک در رده‌های سلولی SW480 به طور قابل توجهی متفاوت از سلول‌های HEK293 به عنوان رده سلولی نرمال است. نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن iNOS در سلول‌های SW480 وHEK293 تفاوت معنی داری با گروه کنترل ندارد ($p > ۰/۰۵$).

کلمات کلیدی: اگزالی پلاتین، سرطان کولون، SW480، HEK293، نیتریک اکساید

مقدمه

سرطان روده بزرگ (کولورکتال) سومین سرطان شایع دنیا و دومین علت مرگ ناشی از سرطان است. علت دقیق بروز سرطان کولورکتال ناشناخته است، ولی پژوهش‌ها نشان داده است عوامل خطر خاصی شانس ابتلا افراد را به سرطان کولورکتال افزایش می‌دهند (۱۷). خاصیت ضدسرطانی داروهای ضدسرطانی سالهاست که شناخته شده است و به همین دلیل استفاده از داروهای مناسب جهت درمان سرطان از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۵). با توجه به این که تغییرات ژنتیکی زیادی مورد نیاز است تا فرم

سرطانی یک سلول ایجاد شود و به علت این که ایجاد بسیاری از سرطان‌ها جنبه ارثی دارد، استفاده از موادی که بتوانند فرآیند متاستازی را مهار کنند مورد توجه می‌باشد، یعنی اگر چه نمی‌توان از ایجاد تومور اولیه جلوگیری کرد، ولی می‌توان جلوی فرآیند متاستازی که علت اصلی مرگ و میر بسیاری از بیماران سرطانی است را گرفت (۲۱). داروی شیمی‌درمانی اگزالی پلاتین (Oxaliplatin) به طور گسترده برای درمان سرطان‌های کولون و رکتوم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). این دارو در سال ۲۰۰۲ میلادی توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) مورد تایید قرار گرفته است. این دارو با نام‌های Eloxetin ، Diaminocyclohexane Oxaloplatinium و L- OHP نیز شناخته می‌شود. این دارو از طریق پیوند متقاطع کمپلکس‌های پلاتین با مولکول‌های DNA از تکثیر و نسخه‌برداری سلولی جلوگیری می‌کند و احتمالا روی سلول‌های جنسی که دارای تقسیمات سلولی و فرآیندهای تمایز پیچیده طی تکوین هستند؛ می‌تواند موثر باشد (۱۲). ترکیباتی که این دارو برای ممانعت از سنتز DNA ایجاد می کند از cisplatin و carboplatin سمی‌تر است (۱۵ و ۲). علاوه بر این بر خلاف cisplatin این دارو می تواند مانع سنتز RNA شود (۱۹).

نیتریک اکساید رادیکال آزادی است که به وسیله آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتاز تولید می‌شد (۱۱). نیتریک اکساید (NO) در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی از جمله انتقال عصبی و دفاع ایمنی و تنظیم مرگ تدریجی سلول (آپوپتوزیس) نقش دارد. نیتریک اکسید یک مولکول با عمر بسیار کوتاه در حد چند ثانیه است که توسط آنزیم شناخته شده‌ای به نام نیتریک اکسید سنتاز (NOS) تولید می‌شود، این مولکول فعال، قابل انتشار، غیرآلی، آزاد و ناپایدار است که در سلول‌های متنوعی تولید می‌شود و اعمال متفاوتی را انجام می‌دهد، به عنوان مثال در سلول‌های ایمنی به ویژه ماکروفاژها، تولید می‌شود و در کشتن باکتری‌ها و یا سلول‌های توموری مشارکت می‌کند (۲۱). ژن iNOS بر اثر عوامل مختلف التهابی بیان می‌گردد و به همین دلیل نوع القایی NOS نامیده می‌شود. ژن القایی نیتریک اکسید سنتاز(iNOS) نوعی آنزیم غیروابسته به کلسیم/کالمودولین را بیان می‌کند که می‌تواند تولید نیتریک اکسید را از L–ارژینین تسریع کند. تنظیم بیان آن در سطح ژن صورت گرفته و میزان بیان آن ارتباط مستقیمی با تولید بالای NO دارد. بررسی بیان iNOS ابزار قدرتمندی برای درک شاخص‌های مولکولی موثر در پاسخ‌های بافتی و سلولی به عوامل خارجی است (۱۰). از اینرو هدف از این پروژه بررسی اثرات داروی اگزالی پلاتین بر تغییرات میزان نیتریک اکساید در رده سلولی کولورکتال SW480 و مقایسه آن با رده سلولی غیرتوموری HEK293 است.

مواد و روش‌ها

داروی اگزالی پلاتین و کشت سلول: داروی اگزالی پلاتین (Eloxatin®; Sanofi, France) با مشخصات وزن مولی ۳۹۷/۲۸۵۸ g/mol با فرمول شیمیایی C8H14N2O4Pt تهیه شد. همچنین، رده سلول سرطانی کولون (SW480) و سلول (HEK293) به عنوان رده سلولی نرمال جهت کنترل از انستیتوپاستور ایران تهیه گردید و در شرایط استاندارد مطابق با پروتکل، در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله، در انکوباتور و تحت شرایط ۵ درصدی دی اکسید کربن و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کشت و پاساژ داده شد و سلول‌ها تا زمان استفاده از آنها در تانک حاوی ازت مایع نگهداری شد (۷).

آماده‌سازی رده‌های سلولی: ابتدا دفریزه کردن و سپس پاساژدهی رده‌های سلولی انجام شد. به منظور دفریز کردن، سلول‌ها از تانک ازت ۱۹۶- درجه

سانتیگراد خارج و کرایوویال‌های حاوی سلول از نیتروژن مایع خارج نموده و فورا در ویال‌ها تا حدی باز شد تا گاز ازت خارج شود. سپس در مجددا بسته و انتهای آنها در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و به آرامی به صورت دورانی حرکت داده شد تا بلور منجمد در دیواره داخلی ویال وجود نداشته باشد که نشان دهنده دفریزه شدن سلول‌ها است. سلول‌ها در محیط کشت DMEM کشت داده شد. پاساژ دادن سلول‌ها طی چند مرحله انجام شد: ۱- خارج کردن (Out) محیط رویی، ۲- شستشو با بافر PBS به منظور جدا کردن سلول‌های بلند شده (سلول‌های مرده)، ۳- افزودن آنزیم ترپسین (۲ mL- ۱/۵)، ٤- افزودن محیط کشت به سلول‌ها، ٥- تعیین درصد سلول‌های زنده با رنگ آمیزی سلول توسط تریبان بلو.

بررسی اثر اگزالی پلاتین بر رده‌های سلولی به روش MTT: این تکنیک به منظور بررسی اثرات اگزالی پلاتین بر روی رده‌ی سلول سرطانی کلون (SW480) و سلول‌های (HEK293) به عنوان رده سلول‌های نرمال جهت کنترل میزان سمیت انجام شد و حدود ۱۰٤سلول در هر چاهک کشت داده شد. بعد از کشت سلول‌ها، پلیت ۹٦ خانه‌ای در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد تا ٦۰ درصد سطح چاهک‌ها پر گردید. جهت تیمار سلول‌ها، رقت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی اگزالی پلاتین در میکروتیوب‌های استریل تهیه شد.

سنجش نیتریک اکساید: جهت سنجش نیتریک اکساید از روش گریس استفاده شد. تعداد 10^5 سلول در پلیت ۲٤ تایی با غلظت‌های اگزالی پلاتین (۱۰ و ۲۰ میکرومولار) به همراه ۸۸۰ µl و یا ۱۷٦ µl آب مقطر ریخته و مخلوط شد در مرحله بعد به ترتیب ۵۰µl و یا ۱۰ µl سولفانامید اضافه شده به مدت ۲٤ ساعت تیمار شد. پس از تیمار ۵۰ میکرولیتر از محیط رویی هر چاهک به ترتیب و در نهایت بعد از افزودن به ترتیب ۵۰ µl و یا ۱۰ µl معرف DMSO و مخلوط نمودن، در طول موج بین ۵٤۰-۵۲۰ nm قرائت شد (۸).

آنالیز کمی بیان ژن با روش Real time PCR: دستگاه Real time PCR از یک سیستم اپتیکی شناسایی خاصیت فلوئوروسنتی (سایبرگرین) به منظور نتایج کمی بهره می‌برد. به دلیل خطاهای متعددی حین پروسه آزمایش و ناپایداری مواد اولیه، از کنترل داخلی (ژن رفرنس یا housekeeping) استفاده شد. با مقایسه بیان آنها با نمونه کنترل و تیمار می‌توان کاهش یا افزایش بیان را مشاهده نمود. از ژن رفرنس GAPDH بدین منظور استفاده شد.

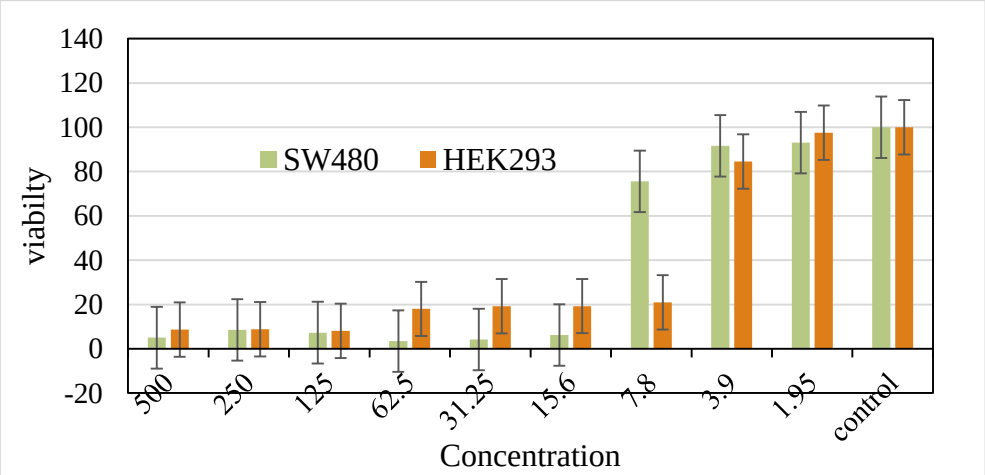
جامعه آماری: سلول‌های سرطانی کولون (SW480) و سلول‌های نرمال HEK293 به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز آماری: جهت معنی دار بودن نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یک طرفه one way ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت Mean±SD ارائه گردید. معیار استنتاج آماری سطح معنی‌دار کمتر از ۰/۰۵ است.

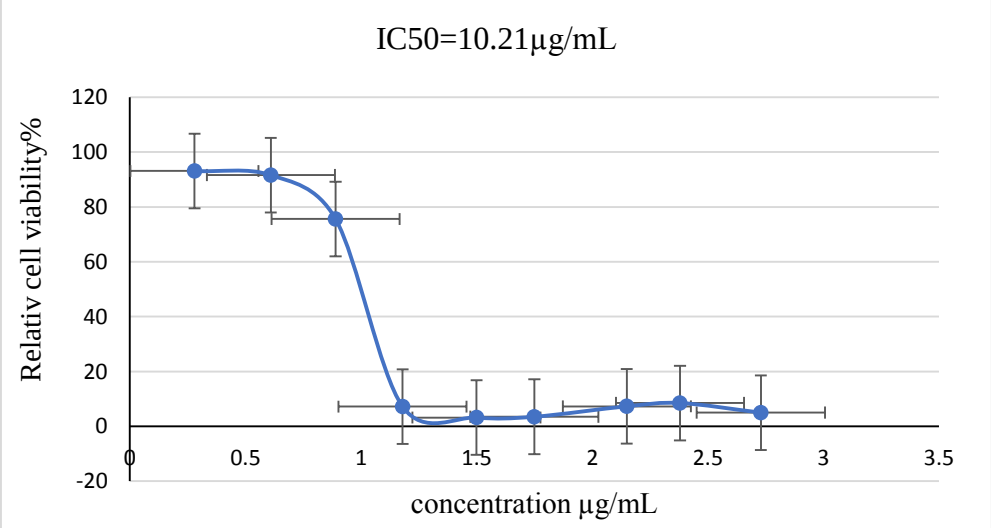
نتایج

در این مطالعه، اثر داروی اگزالی پلاتین بر روی سلول-های SW480، در مقایسه با گروه کنترل، در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که با افزایش غلظت اگزالی پلاتین، زنده‌مانی سلول‌های SW480 در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است (P> ۰/۰۵). همچنین اثر داروی اگزالی پلاتین بر روی سلول‌های HEK293، در مقایسه با گروه کنترل، مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج حاصل از آن در نمودار ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج

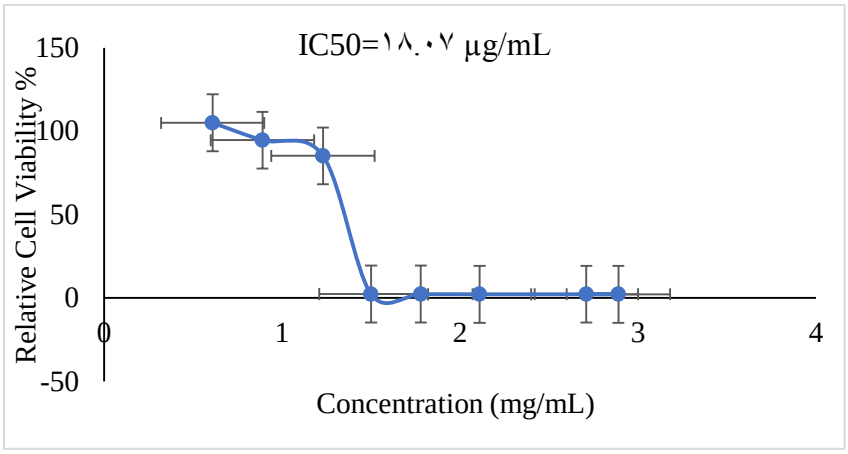
بدست آمده با افزایش غلظت اگزالی پلاتین زنده مانی سلول‌های HEK293 نسبت به گروه کنترل، دچار تغییر معنی‌دار نشده است ($p > ۰/۰۵$) (نمودار۲). میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط سلول SW480 در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف از داروی اگزالی پلاتین در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل ندارد ($p > ۰/۰۵$) (نمودار ۳). در سلول HEK293 میزان تولید نیتریک اکساید در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف از داروی اگزالی پلاتین کمتر از سلول‌های SW480 بوده است. در این سلول HEK293 میزات تولید نیتریک اکساید در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل از اختلاف معنی‌داری برخوردار نبوده است ($P> ۰/۰۵$) ولی در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل از اختلاف معنی داری برخوردار بوده است ($P< ۰/۰۵$) .میزان بیان ژن iNOS در سلول‌های SW480 و HEK293 نسبت به گروه کنترل از اختلاف معنی‌داری برخوردار نبودند ($P> ۰/۰۵$) (نمودار ٤).



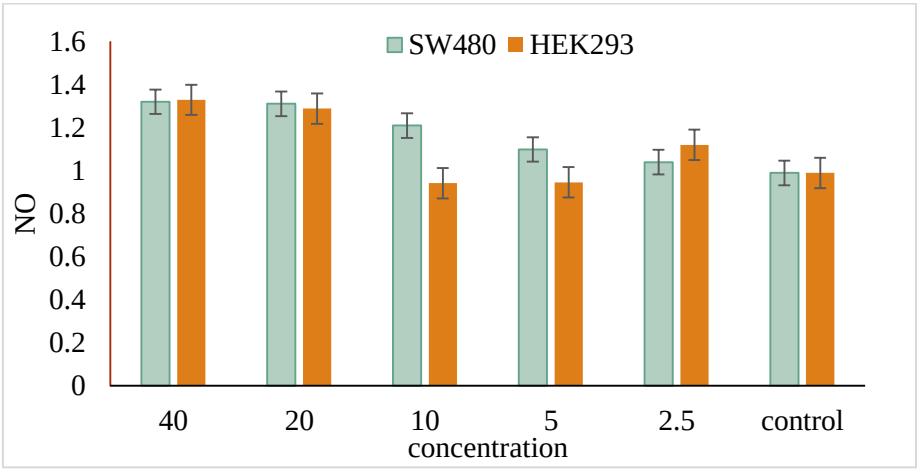
نمودار ۱- بررسی زنده‌مانی (viability) سلول‌های SW480 و HEK293 در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف داروی اگزالی پلاتین



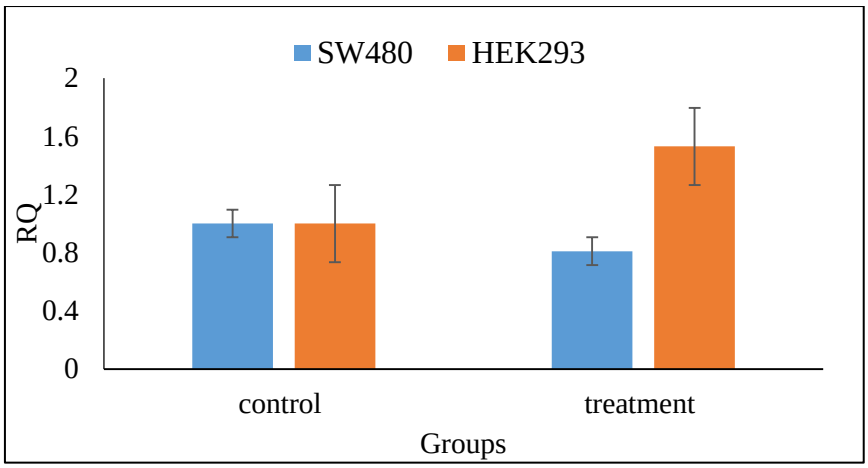
نمودار ۲- بررسی میزان حداقل دور مهارکنندگی (IC50) غلظت‌های مختلف داروی اگزالی پلاتین بر روی سلول‌های **HEK293**



نمودار ۳- بررسی میزان حداقل دور مهارکنندگی (IC50) غلظت‌های مختلف داروی اگزالی پلاتین بر روی سلول‌های SW480



نمودار ٤- بررسی میزان تولید نیتریک اکساید توسط سلول SW480 و HEK293 در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف از داروی اگزالی پلاتین



نمودار ۵- میزان بیان ژن iNOS بوسیله سلول SW480 و HEK293 در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف داروی اگزالی پلاتین

بحث

هدف از این تحقیق ارزیابی اثرات اگزالی پلاتین بر تکثیر و فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی در رده‌های سلولی HEK293 و SW480 بود. در این مطالعه، اثر داروی اگزالی پلاتین در غلظت‌های

مختلف بر روی سلول‌های SW480، در مقایسه با گروه کنترل، مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج حاصل نشان داد که زنده‌مانی سلول‌های SW480 در گروه-های دریافت داروی اگزالی پلاتین، نسبت به گروه کنترل، دچار تغییر معنی‌دار شده است ($P< ۰/۰۵$) و به عبارت دیگر در این غلظت‌ها داروی اگزالی پلاتین دارای اثر کشندگی بر رده سلولی داشته است. اثر داروی اگزالی پلاتین بر روی سلول HEK293 در غلظت‌های مورد بررسی نسبت به گروه کنترل، دچار تغییر معنی‌داری نشده است ($P> ۰/۰۵$). از مقایسه نتایج این نکته استنباط می‌شود که اثر کشندگی داروی اگزالی پلاتین بر روی سلول‌های SW480 بیشتر از سلول HEK293 می‌باشد. البته بررسی نقش مهاری داروی اگزالی پلاتین بر روی سایر سلول‌های سرطانی نیز نشان از اثربخشی قوی این دارو داشته است (نمودار ۱). تاکنون مطالعات مختلفی در جهت استفاده از داروی اگزالی پلاتین در درمان انواع سرطان‌ها انجام شده است که نتایج این مطالعات با این مطالعه همسو بوده است. Shisheng و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین را به‌همراه ترکیب ۳–متیل آدنین مورد بررسی قرار دادند (۱۳). در این مطالعه با استفاده از روش MTT اثرات سمیت سلولی داروی فوق الذکر 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 و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین را به‌همراه پیریدینیل کربوکساماید را بر روی رده سلولی سرطان ریه (NCI-H1299) مورد مطالعه قرار دادند (۱۶). نتایج این مطالعه نشان داد که سمیت سلولی ترکیب فوق وابسته به دوز است و توانایی القا آپوپتوز را دارد. همچنین مطالعه دیگری، ارزیابی آنتی اکسیدانتی و ضد سرطانی ناتوژل‌های حاوی داروی اگزالی پلاتین روی سلول‌های سرطانی کولون (HT29) را نشان دادند. نتایج این پژوهش پتانسیل بالای ناتوژل‌ها در کاهش ۱۶/۳۹ درصدی زنده ماندن رده سلولی سرطان کولون را نشان داد (۱۶). گزارش‌های مختلفی نشان می‌دهند که اگزالی پلاتین، نیتریک اکساید را کاهش می‌دهند و مطالعات بسیاری نقش سمیت سلولی اگزالی پلاتین را از طریق مهار تولید نیتریک اکساید با جزئیات به نیتریک اکساید ناشی از نیتریک اکساید سنتاز را مهار می‌نماید، اثبات رسانیده‌اند. یونسی و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای به 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 پرداختند. 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 LC50 ,۶ میکروگرم بر میلی لیتر 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 ۲/۶۹ و ۳/۲۶ افزایش یافت و با توجه به سمیت سلولی و القای فرایند آپوپتوزیس در رده سلولی سرطان کلون توسط داروی اگزالی پلاتین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که داروی اگزالی پلاتین گزینه مناسبی جهت درمان سرطان کلون می-باشد (۱۸). نتایج این مطالعه 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 تنفس سلول در میتوکندری می‌باشدواثر کشندگی دارو بر روی سلول-

ها، بستگی به غلظت دارو دارد. همچنین در این مطالعه به بررسی نقش داروی اگزالی پلاتین در تولید و ترشح NO توسط سلول های رده سرطانی کولون (SW480) و سلول‌های نرمال بدن (HEK293) پرداخته شده است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داده است که میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط سلول SW480 در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف از داروی اگزالی پلاتین در غلظت‌های ۱۰ ، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل از اختلاف معنی‌داری برخوردار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$) ولی در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل ندارد ($p > ۰/۰۵$). در سلول HEK293 میزان تولید نیتریک اکساید در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف از داروی اگزالی پلاتین کمتر از سلول SW480 بوده است. در سلول HEK293 میزان تولید نیتریک اکساید در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل از اختلاف معنی‌داری برخوردار نبوده است ($P> ۰/۰۵$) ولی در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل از اختلاف معنی‌داری برخوردار بوده است ($P< ۰/۰۵$) (نمودار ٤). دانایی و همکاران (۱۳۹٤) در طی پژوهشی به بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گل بابونه و اوستین بر میزان بقای سلولی و تولید نیتریک اکساید در رده سلولی HT29 سرطان کولورکتال انسانی پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه اثر مهاری عصاره گل بابونه و اوستین را بر آزادسازی نیتریک اکسید در رده نشان داد همچنین آزمون MTT نشان داد که اثر مهاری بر روی رشد و تکثیر رده سلولی عصاره گل بابونه و داروی اوستین وابسته به زمان و غلظت است. همچنین نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی گل بابونه اثر مهاری بر رشد و تکثیر رده سلولی دارد. تولید نیتریک اکساید به وسیله سلول-های HT293 پس از تیمار به وسیله عصاره دارویی اوستین کاهش یافت این اثر با مهار آنزیوژنز رابطه مستقیم داشته و اثر ضد متاستازی را نشان داد (٤).

در مطالعه سلیمانی و همکارانش (۲۰۱٦)، اثرات تنظیم کنندگی ایمنی و ضد توموری اسانس زیره سبز بر روی ماکروفاژهای صفاقی و ماکروفاژهای فعال شده با لیپوساکارید مورد بررسی قرار گرفت. میزان بقاء ماکروفاژها همچنین میزان تولید نیتریک اکساید در غلظت‌های ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از اسانس زیره سبز کمتر از گروه کنترل گزارش شد (۱٤).

در این مطالعه علاوه بر بررسی تولید NO، میزان بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز نیز با استفاده از روش مولکولی Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان بیان ژن iNOS در سلول‌های SW480 و HEK293 نسبت به گروه کنترل از اختلاف معنی‌داری برخوردار نبوده اند ($p >۰/۰۵$)(نمودار ۵).

در مطالعه مشابه Farghaly و همکارانش در سال ۲۰۱۲ طی مطالعه‌ای به بررسی اثرات مقایسه‌ای داروهای ضد افسردگی سه حلقه‌ای بر بیان iNOS در مدل درد نوروپاتیک پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که داروهای ضد افسردگی سه حلقه-ای (آمی تریستیلین) باعث مهار iNOS در مخچه و هیسوکامپ می‌شود. همچنین، نتایج حاصل از این نشان داد که اثرات مهار کننده سروتونین و آمی تریستیلین ناشی از مهار مرکزی iNOS می‌باشد (٦).

Narayanan و همکارانش در سال ۲۰۰۳ به بررسی اثرات docosahexaenoic acid بر میزان iNOS و ژن‌های پیش التهابی مرتبط پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که docosahexaenoic acid باعث مهار بیان iNOS و بیان ژن‌های مرتبط در سلول های سرطان کولون می شود. چونکه به نظر می‌رسد که iNOS/NO در پاتوژنز سرطان کولون نقش دارند، و مهار انتخابی این ژن ها به می‌توانند به عنوان عوامل

شیمی درمانی در نظر گرفته شوند. همچینین، محققین این تحقیق پیشنهاد دادند که مهارکننده‌های iNOS/NO می‌توانند از عوامل موثر بر علیه سرطان زایی کولون در مدل‌های پیش بالینی باشند (۹). در مطالعه‌ی بارانی و همکاران که در سال ۲۰۱۶ انجام شد به بررسی بیان ژن iNOS در بیماران مبتلا به سرطان مری با استفاده از روش Reverse Transcriptase Real-Time پرداختند، در این مطالعه بررسی بیان ژن iNOS در بیماران مبتلا به سرطان مری در ایران مورد مطالعه قرار گرفت. ۱۵ نمونه بافت پارافینه سرطان مری FFPE و ۱۵ نمونه FFPE سالم جمع آوری شده از مراکز مختلف پزشکی درمانی (زابل، زاهدان، کاشان) جهت اندازه‌گیری بیان ژن iNOS توسط روش Reversese transcriptase Real – Time Polymerase Chain Reaction آنالیزگردید. تمامی واکنش‌های PCR با سه تکرار برای ژن iNOS وکنترل داخلی (β-actin) توسط متد $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livac) انجام شد. تفاوت در بیان ژن هدف در بیماران و کنترل توسط روش t-test محاسبه شد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین بیان ژن iNOS در دو گروه بیمار وکنترل وجود نداشت ($p > ۰/۰۵$) ولی در گروه بیمار بیان ژن iNOS افزایش یافته بود. از سوی دیگر اختلاف معنی‌داری بین بیان ژن iNOS بین مردان و زنان در دو گروه بیمار و سالم وجود داشت و در زنان نسبت به مردان بیشتر بود ($p < ۰/۰۵$). جهت بررسی و مطالعات بیشتربه حجم نمونه بزرگتر و جمعیت‌های دیگر برای تایید این یافته نیاز می باشد (۱).

نتیجه‌گیری

داروی اگزالی پلاتین، با اثربخشی در مرگ سلول‌های سرطانی SW480 می‌تواند بعنوان داروی ضد سرطان، مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. همچنین این دارو، با بی اثر بودن بر روی سلول‌های طبیعی بدن، نشان داده است که دارای اثرات جانبی، بر روی سلول‌های انسانی نمی‌باشد و نتایج حاصل از این مطالعه این دارو را بعنوان کاندیدی ایمن، برای درمان سرطان معرفی کرده است.

منابع

1. Barani R., Motalleb G., Maghsoudi H. 2016. Evaluation of iNOS Expression in Esophageal Cancer Patients. *Gastrointestinal Tumors*, 3:44-58 [In Persian].

2. Basaki Y., Chikahisa L., Aoyagi K., Miyadera K., Yonekura K., Hashimoto A., Okabe S., Wierzba K., Yamada Y. 2001. Gamma hydroxybutyric acid and 5-fluorouracil, metabolites of UFT, inhibit the angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis*, 4: 163-73.

3. Bleiberg H. 1998. Oxaliplatin (L.OHP): a new reality in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 77(4):1-3.

4. Danaei N., Panahi Kokhdan E., Manzouri L., Nikseresht M. 2016. The Effect of bevacizumab and hydroalcohlic Extract of *Matricaria chamomilla* on cell viability and nitric oxide production of the colorectal cancer cell line (HT-293). *Armaghan Journal*, 20(12):1107-1118 [In Persian].

5. De Rosa M., Pace U., Rega D., Costabile V., Duraturo F., Izzo P., Delrio P. 2015. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncology and Reproduction*, 34(3):1087-1096.

6. Farghaly H.S.M., Abdel-Zaher A.O., Mostafa M.G., Kotb H.I. 2012. Comparative evaluation of the effect of tricyclic antidepressants on inducible nitric oxide synthase expression in neuropathic pain model. *Nitric oxide*, 27(2):88-94.

7. Fung T.C., Vuong H.E., Luna C.D., Pronovost G.N., Aleksandrova A.A., Riley N.G. 2019. Intestinal serotonin and fluoxetine exposure modulate bacterial colonization in the gut. *Nature Microbiology*, 4(12):2064-2073.

8. Mansoori F., Sepehri H., Delphi L. 2016. Effect of pectin substances on no release and apoptosis induction in human prostate cancer cells Ln cap. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology*, 29(4):480-492 [In Persian].

9. Narayanan BA., Narayanan NK., Simi B., Reddy BS. 2003. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 63(5):972-979.

10. Oliveira G.A., Cheng RY., Ridnour L.A., Basudhar D., Somasundaram V., McVicar D.W. 2017. Inducible nitric oxide synthase in the carcinogenesis of gastrointestinal cancers. *Antioxidants and Redox Signaling*, 26(18):1059-1077.

11. Pistritto G., Trisciuoglio D., Ceci C., Garufi A, D'Orazi G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4):603-619.

12. Raymond E., Faivre S., Woynarowski J.M., Chaney S.G. 1998. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Seminars in Oncology*, 25(2 Suppl 5):4-12.

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

14. Soleimani N., Daneshmandi S., Sattari M., Pourfathollah AA. 2011. Immuno-modulatory and anti-tumor effects of cuminum cyminum essential oil. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 13(4):22-29 [In Persian].

15. Tashiro T., Kawada Y., Sakurai Y., Kidani Y. 1989. Antitumor activity of a new platinum complex, oxalato (trans-l-1,2-diaminocyclohexane) platinum (II): new experimental data. Biomed. *Pharmacology and Therapeutics*, 43:251-60.

16. Teixeira S.F., Azevedo R.A., Silva A.C., Braga R.C. 2016. Evaluation of cytotoxic effect of the combination of a pyridinyl carboxamide derivative and oxaliplatin on NCI-H1299 human non-small cell lung carcinoma cells. *Biomedical Pharmacotherapy*, 84:1019-1028.

17. Urruticoechea A., Alemany R., Balart J., Villanueva A., Viñals F., Capellá G. 2010. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1):3-10.

18. Yonesi B., Mirzaie A., Aliasgari E. 2018. 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. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 8(4): 364-373 [In Persian].

19. Yonekura K., Basaki Y., Chikahisa L., Okabe S., Hashimoto A., Miyadera K., Wierzba K., Yamada Y. 1999. UFT and its metabolites inhibit the angiogenesis induced by murine renal cell carcinoma, as determined by a dorsal air sac assay in mice. *Clinical Cancer Research*, 5: 2185–91.

20. Zeng C., Yu F., Yang Y., Cheng X.2016. Preparation and evaluation of oxaliplatin thermosensitive liposomes with rapid release and high stability. *PLoS One*, 11(7):158-162.

21. Zhang S., Chen H., Gerhard GS. 2010. Heme synthesis increases artemisinin-induced radical formation and cytotoxicity that can be suppressed by super oxide scavengers. *Chemico-biological Interactions*, 186(1):30-35.

22. Zhang N. 2015. Ceramide: Therapeutic potential in combination therapy for cancer treatment. *Current Drug Metabolism*, 17(1):37-51.

Comparison of the Effects of Oxaliplatin on Nitric Oxide Synthase Activity in Colorectal Cancer (SW480) Compared to Normal Cells (HEK293)

Ayoub Ahmadi[1], Tahereh Naji[1*], Rahim Ahmadi[2]

1- Department of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tehran Medical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Biology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Abstract

Colon cancer is one of the most common tumors in the human population. There are many drugs on the market to treat different types of cancer, but their use is limited due to toxic effects and side effects, and in the last ten, experts in this field are looking for suitable alternatives to common anti-cancer drugs. This study was aimed to assess the comparison of the effects of oxaliplatin on the nitric oxide level in colorectal adenocarcinoma SW480 and non-tumor HEK293 cell lines. In this experimental study, Oxaliplatin was prepared at concentrations of 1.95, 3.90, 7.8, 15.6, 32.25, 62.5, 125, 250 and 500 µg/ml and the cytotoxic effect was investigated on HEK293 and SW480 cell lines using MTT method. Nitric oxide was measured by Grease method and Real Time PCR technique was applied to evaluate the iNOS gene expression. Finally, one-way ANOVA and t-test were used to analyze the data. The results of this study indicated that Oxaliplatin had a lethal effect on the SW480 cell line at concentrations of 7.8 to 250 µg/ml, but showed no cytotoxic effects on normal cell lines at other concentrations. Oxaliplatin at concentrations of 10, 20, and 40 µg/ml significantly increased nitric oxide production in SW480 cells compared to HEK293 cells, which served as the normal cell line. The results of Real Time PCR showed that the expression of the iNOS gene in both SW480 and HEK293 cells was not significantly different from the control group, but was higher. The results indicated that use of oxaliplatin can cause excellent therapeutic effects on cancer cell lines with minimum side effects.

Keywords: Oxaliplatin, Colon cancer, SW40, HEK293, Nitric Oxide.