

بررسی اثرات سلولی آنتی باکتریهای سولفاتiazول و سولفاستامید بر روی سلولهای سرطان سینه (رده سلولی T-47D)

راضیه محمدپور، شاهرخ صفریان*، سعید نوروزی و عاطفه رزازان

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، گروه سلولی و مولکولی

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۱۴

چکیده

داروهای ضد باکتریایی اولیه موسوم به داروهای سولفونامیدی دارای اثرات زیستی بسیاری است که موجب کاربرد گسترده بالینی آن شده است. با توجه به گزارشهایی مبنی بر اثرات ضد سرطانی بعضی از اعضای این خانواده دارویی، در این پژوهش اثرات سلولی سولفاتiazول و سولفاستامید، دو آنتی باکتریال از این خانواده بر رده سلولی سرطان سینه T-47D بررسی گردید. علائم ریخت شناسی ویژه آپوپتوز توسط میکروسکوپ فلوروسنت پس از رنگ آمیزی با Annexin-PI، و نیز نتایج حاصل از مطالعات فلوسیتومتری نشان داد که درصد سلولهای آپوپتوز شده در سلولهای T-47D تیمار شده با سدیم سولفاتiazول و سدیم سولفاستامید در قیاس با شاهد منفی بسیار اندک می باشد. این موضوع علی رغم افزایش معنی دار میزان فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در سلولهای تیمار شده با دارو مشاهده می گردید. بررسیهای صورت گرفته به روی نمودارهای فلوسیتومتری رسم شده با استفاده از ردیاب DAPI مؤید آن بود که این داروها قادر به توقف سلولها در فازهای مختلف چرخه سلولی نیز نمی باشند. در اینجا اثر داروی دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. به دنبال این یافته ها نشان داده شد که سدیم سولفاتiazول با کاهش سطح بیان ژنهای Akt1، Akt2 و mTOR و نیز افزایش سطح بیان PTEN، بقای سلولی را کاهش می دهد اما این مکانیسم برای سدیم سولفاستامید قابل مشاهده نمی باشد. سازوکار اثرات ضد سرطانی سدیم سولفاستامید با توجه به افزایش سطح بیان ژنهای Akt1، Akt2، mTOR و نیز کاهش سطح بیان PTEN می تواند از طریق راه اندازی مسیر اتوفاژی بقاء و کاهش سرعت تقسیم سلولی اعمال شده باشد.

واژه های کلیدی: سولفاتiazول، سولفاستامید، سرطان سینه، آپوپتوز، توقف چرخه ی سلولی، اتوفاژی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۳۳۱۲، پست الکترونیکی: safarian@ibb.ut.ac.ir

مقدمه

این مولکول نهفته است. در سال ۱۹۳۷ سولفاپیریدین ساخته شد که اولین سولفونامید موفق در درمان ذات الریه محسوب می گردید. پس از آن سایر سولفونامیدها نیز نظیر سولفاتiazول، سولفادiazین ساخته شدند (۱۲). تا کنون بیشتر از ۳۳۰۰ سولفونامید ساخته شده است اما فقط تعداد کمی از آنها در مصارف دارویی استفاده و در بسیاری از موارد به عنوان ماده ای باکتریواستاتیک استفاده می شوند (۱۲). داروهای سولفا (Sulfa Drugs) رشد و تکثیر برخی از باکتریها را با دخالت در فرآیند ساخت فولیک اسید مهار

ترکیب پاراآمینوبنزوئیک اسید که امروزه "سولفونیلامید" نامیده می شود در سال ۱۹۰۸ برای اولین بار ساخته شد، اما ارزش درمانی آن سالها پس از آن مشخص گردید (۱۲). در سال ۱۹۳۲ یک مؤسسه تجاری آلمانی ترکیب قرمز رنگی به نام ۴- (۴- سولفامیل فنیلازو) -ام - فنیلندیمین را تولید کرد که در سال ۱۹۳۵ اثرات درمانی آن گزارش و به نام "پروتوسیل" نام گذاری گردید (۲۴، ۱۲). در همین سالها یک گروه محقق فرانسوی کشف کرد که خاصیت ضد باکتریایی این ترکیب در بخش پاراآمینوبنزن سولفونامیدی

می‌تواند با بروز یک سری از عوارض جانبی مانند تهوع، سردرد، واکنشهای حساسیتی شدید و واکنشهای آلرژیک و ایجادکننده راشهای پوستی عمیق همراه باشد (۱۷).

دوکسوروبیسین یک آنتی بیوتیک آنتراسایکلین است که به عنوان یکی از مؤثرترین و پرمصرفترین عوامل شیمی درمانی در درمان لوکمیا، لمفوما و انواع تومورهای جامد به کار می‌رود (۲۲). اگرچه اثرات کاردیوتوکسیک این دارو، پتانسیل بالینی آن را تا حدی محدود می‌کند (۳۱). دوکسوروبیسین در سطح سلولی بین دو باز آلی در DNA ی دو رشته‌ای وارد می‌شود و از این طریق باعث مهار RNA و DNA پلیمرز وابسته به DNA و در نتیجه مهار سنتز RNA و DNA و در نهایت آسیب به سازوکارهای تعمیر DNA می‌گردد. از طرفی این دارو با مهار کارکرد آنزیم توپوایزومراز II ساخت DNA را دستخوش اختلال می‌کند (۲۲). این دارو با اتصال به لیپیدهای غشای پلاسمایی، بسیاری از کارکردهای سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از آن جمله می‌توان به تشکیل رادیکالهای آزاد مانند OH^- اشاره نمود. سلولهای تیمار شده با دوکسوروبیسین ویژگیهای فعال شدن مسیر آپوپتوز و نیز توقف چرخه سلولی را از خود نشان می‌دهد که به همین علت به عنوان یک داروی مؤثر در شیمی درمانی سرطان کاربرد دارد (۳، ۷، ۳۰).

در این پژوهش، تلاش بر این بود که نحوه اثر گذاری دو عضو از اعضای خانواده دارویی سولفونامیدها (سولفاستامید و سولفاتiazول) را از لحاظ کاهش تکثیر و بقاء سلولی به روی سلولهای سرطانی T-47D مورد بررسی قرار داده تا از این طریق بتوان در طراحی مشتقات جدید سولفونامیدی و یا سایر داروهای غیر سولفونامیدی که محل اثر آنها در محلی مشابه داروهای سولفونامیدی است گام‌های مؤثرتری را برداشت.

می‌کنند اما آنها را نمی‌کشند (۳۲، ۱۶). از بین سولفونامیدهای ساخته شده ترکیبات متعددی وجود دارد که فعالیتهای مهاری را در مقابل پروتئازهای مختلفی مانند متالوپروتئازها، سرین پروتئازها، سیستئین پروتئازها و آسپاراتات پروتئازهای به دست آمده از پستانداران و یا ویروسها نشان می‌دهند و به همین علت فعالیتهای ضد ویروسی، ضد توموری و ضد التهابی را از خود ظاهر می‌سازند (۳۳). بعضی از مشتقات سولفونامیدی با خاصیت ضد سرطانی گزارش شده‌اند که از جمله می‌توان به E7070 و E7010 به عنوان مهار کننده‌های تجمع میکروتوبولها اشاره نمود که از این طریق باعث توقف چرخه سلولی می‌شوند (۱۱، ۲۹، ۲۸). ایندول سولفونامیدها با مختل کردن تجمع دینامیکی میکروتوبولهای دوک میتوزی تکثیر سلولی را مهار می‌کنند و با القاء آپوپتوز در طی مسیر وابسته به Bcl-2 سلولهای سرطانی را می‌کشند (۲۵).

از جمله داروهای سولفا، می‌توان سولفاتiazول و سولفاستامید را نام برد. سولفاتiazول در اواسط ۱۹۳۰ کشف و در ابتدا برای مقابله با توپرکلوزیس استفاده شد (۳۵). سولفاتiazول ویژگی ضد باکتریایی و ضد میکروبی دارد و فرمول شیمیایی آن $C_9H_9N_3O_2S_2$ می‌باشد. نام شیمیایی این دارو ۴- آمینو-N - (۱-تiazول-۲- ثیل) بنزن سولفونامید است. این دارو به عنوان ادرار آور، مهار کننده آنزیم کربونیک انیدراز و یا ضد تشنج کاربرد دارد و از جمله موارد استعمال آن می‌توان به درمان مکمل در برخی از بیماریهای ویروسی و باکتریایی مانند عفونتهای پنومونی و یا سایر عفونتهای ریه و عفونتهای مجاری ادراری اشاره نمود (۲۱). سولفاستامید دارای نام علمی N- (۴-آمینوفیل) سولفونیل استامید و فرمول مولکولی $C_8H_{10}N_2O_3S$ می‌باشد. کاربرد بالینی متداول این دارو در ترکیب با دو داروی سولفونامیدی دیگر به نام سولفاتiazول و سولفابنزامید در ساختار پماد موضعی برای درمان عفونتهای خاص واژینال می‌باشد. استفاده از این داروها

مواد و روشها

مواد و دستگاهها: محیط کشت سلول Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 و سرم جنین گاوی از شرکت Gibco (انگلستان) و محلول پنیسیلین-استرپتومایسین از شرکت Roche (آلمان) خریداری گردید. محلول ۳-[-۵،۴- دی متیل تiazول-۲-تیل]-۵،۲-در فنیل تترازولیوم برومید (MTT) و محلول تریپسین-EDTA از شرکت سیگما (انگلستان) خریداری شد. کیتهای رنگ آمیزی Annexin-V-FLOUS، کیت رنگ آمیزی پروپیدیوم یدید (PI)، کیت سنجش فعالیت کاسپاز-۳، کیت DNA Lddering و کیت ۶،۴-دی آمیدینو-۲-فنیل ایندول (DAPI) همگی از شرکت Roche (آلمان) خریداری گردید. کیت استخراج RNA و کیت QuantiFast™ SYBR Green Real time RT-PCR master mix از شرکت کیاژن (آمریکا) تهیه شد. آنزیم رونوشت بردار معکوس (RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase) و پرایمر رندوم هگزامر از شرکت Fermentas (آلمان) خریداری گردید. خریداری داروی دوکسوروبیسین از شرکت Ebewe-Pharma (اتریش) و سولفاستامید و سولفاتiazول از شرکت سینا دارو صورت گرفت. دستگاه ثبت الیزا ساخت شرکت Rayto (چین)؛ میکروسکوپ فلوروسانس ساخت شرکت Axisplan2 Zeiss (آلمان)؛ طیف نور سنج فلوروسانس مدل MPF-4A ساخت شرکت HITACHI (ژاپن)؛ طیف نورسنج Nanodrop ساخت شرکت ThermoScientific (آمریکا) بوده اند و دستگاه فلوسیتومتر ساخت شرکت Partec (آمریکا) مجهز به نرم افزار FloMax بوده است.

رده سلولی، شرایط کشت سلولی و تیمار سلولی: T-47D رده سلولهای چسبنده با منشأ اپیتلیالی مجاری شیری از بانک سلولی ایران (با کد HTB-133 ATCC) تهیه گردید. RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاو (۱۰ درصد حجم/حجم) و محلول پنیسیلین/استرپتومایسین (۱)

درصد حجم/حجم) به منظور فراهم کردن محیط مناسب برای رشد بهینه سلولها انتخاب و استفاده گردید. سلولها تحت شرایط کنترل شده دما (۳۷ درجه سانتی گراد) و اتمسفر مرطوب حاوی CO₂ (۵ درصد حجم/حجم) کشت داده شد. با توجه به نتایج حاصل از سنجش MTT میزان LC₅₀ برای داروهای سدیم سولفاتiazول، سدیم سولفاستامید و دوکسوروبیسین بعد از ۴۸ ساعت به ترتیب ۶/۵ mM، ۴۱ mM و $10^{-3} \times 0.337$ mM به دست آمد. محلولهای دارویی با غلظتهای مورد نظر پس از حل کردن مقدار گرم لازم از داروها در محیط کشت ساخته شد و با بهره گیری از فیلترهای ۰/۲۲ μm استریل گردید. در شرایط استریل، تعویض محیط کشت سلول (فلاسکهای سلولی با پراکنش سلولی ۸۰ درصد) با محلولهای دارویی از پیش ساخته شده (با غلظتهای مورد نظر از دارو) انجام شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت برداشت سلولی صورت گرفت. در زمان برداشت سلولی، بعد از تخلیه محیط کشت حاوی دارو، سلولها تریپسین و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (حدود ۳ تا ۵ دقیقه) از کف فلاسک جدا شدند و با استفاده از بافر فسفات-سالین، سه بار در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در دور ۲۵۰۰rpm مورد شستشو قرار گرفتند و سپس به فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد انتقال یافتند.

آزمون MTT: بر اساس این آزمون، در هر یک از چاهکهای یک پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۰^۴ سلول انتقال و کشت داده شد. پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، محیط کشت حاوی غلظتهای مختلف دارو با محیط قبلی جایگزین و سلولهای کشت داده شده در سه پلیت مجزا برای زمانهای انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط کشت نگهداری شد. هر غلظت از دارو در سه چاهک تکرار شده و از سوی دیگر آزمایش در حداقل سه تکرار مجزا برای هر زمان انکوباسیون صورت گرفت به نحوی که برای هر غلظت دارو حداقل نه تکرار موجود باشد. بعد از گذشت

از نور محیطی مورد رؤیت قرار گرفت. برای جلوگیری از خشک شدن لامل و افزایش وضوح تصویر μl ۳-۵ Mounting Media در فاصله لام و لامل قرار داده شد.

سنجش آپوپتوز و نکروز و بررسی چرخه تقسیم سلولی با بهره گیری از روش فلوسیتومتری: به منظور تعیین تعداد سلولهای آپوپتوزی و نکروزی در یک جمعیت سلولی تیمار شده با هر دارو و قیاس آن با جمعیت سلولی در شاهد منفی، رنگ آمیزی سلولها با دو رنگ Annexin-FITC و پروپیدیوم یدید (PI) طبق دستور کار کیت انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار دستگاه و در پی تقسیم بندی در منحنی دوبعدی Annexin-FITC علیه PI به چهار ناحیه Q_1 تا Q_4 صورت گرفت. در این تقسیم بندی، ناحیه Q_1 نمایانگر سلولهای نکروزی با ویژگی Annexin-FITC^- و PI^+ ؛ ناحیه Q_2 نمایانگر سلولهای آپوپتوز شده پیر با ویژگی Annexin-FITC^+ و PI^+ ؛ ناحیه Q_3 نمایانگر سلولهای سالم با ویژگی Annexin-FITC^- و PI^- و ناحیه Q_4 نمایانگر سلولهای آپوپتوزی جوان با ویژگی Annexin-FITC^+ و PI^- می‌باشد (۱۳ و ۲۰). همچنین برای اندازه گیری محتوای DNA در سلولهای یک جمعیت سلولی، به منظور مقایسه‌ی نحوه توزیع سلولها در فازهای مختلف چرخه سلولی در نمونه‌های تیمار شده با دارو و نمونه کنترل منفی، از نشانگر DAPI استفاده شد. در این روش، تعداد 5×10^5 سلول در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی با محلول DAPI در بافر PBS با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ حاوی ۶ درصد TritonX-100 انکوبه گردید. سپس نشر فلئورسانس نشانگر به کار رفته پس از برانگیختگی در طول موج ۳۵۹ nm ثبت گردید. ثبت فوتونهای نثری در طول موج ۴۶۱ nm و تجزیه و تحلیل داده‌ها به روی منحنی دوبعدی تعداد سلولها در برابر سطح زیر پیک (Area) با استفاده از نرم افزار FloMax انجام شد.

زمان‌های مورد نظر، به هر چاهک $25 \mu\text{l}$ از محلول ذخیره‌ی MTT با غلظت 4 mg/ml یا $100 \mu\text{g/well}$ افزوده و پس از گذشت زمان سه ساعت، با افزودن $100 \mu\text{l}$ حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) میزان محصول فورمازان تولید شده توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین گردید. توان زیستی سلولهای تیمار شده با دارو (در هر غلظت از دارو) به شکل نسبت درصد جذب نوری فورمازان تولیدی در نمونه در قیاس با میزان جذب نوری فورمازان تولیدی در شاهد منفی (سلولهای بدون تیمار دارویی) تعیین و در یک منحنی دوبعدی (درصد توان زیستی یا بقاء سلولها در مقابل غلظت دارو) نشان داده شد. با استفاده از این منحنی می‌توان LC_{50} را برای داروهای مورد نظر محاسبه و تعیین نمود.

بررسی ریخت شناسی سلولها با استفاده از میکروسکوپ فلئورسانس: بررسی حضور فسفاتیدیل سرین در نیم غشاء خارجی سلولها به عنوان یک ویژگی مهم در سلولهای آپوپتوزی، به همراه نفوذ پروپیدیوم یدید به داخل هسته سلولهای آپوپتوزی پیر و یا سلولهای نکروزی با بهره گیری از کیت رنگ آمیزی Annexin-V-FLOUS و میکروسکوپ فلئورسانس صورت گرفت (۱۰). در این روش سلولها به روی لامهای پوشانده شده با پلی‌ال-لیزین ۱ درصد در پتری دیشهای با قطر ۳ cm کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت با تخلیه محیط کشت رویی، محیط کشت حاوی غلظت LC_{50} دارو (سدیم سولفاتیارول، سدیم سولفاستامید) افزوده گردید. پس از طی شدن زمان انکوباسیون مورد نظر (۴۸ ساعت) محلول رنگی Annexin V-FITC ($20 \mu\text{g/ml}$) و پروپیدیوم یدید ($20 \mu\text{g/ml}$) به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و در دمای ۲۵-۱۵ درجه در تاریکی در مجاورت سلولها قرار گرفت. سپس با برگرداندن لامل به روی یک لام شیشه‌ای تمیز تصاویر سلولی در درشت نمایی‌های مختلف در زیر میکروسکوپ فلئورسانس (طول موج تحریکی ۴۵۰-۵۰۰ nm و طول موج ثبتی ۵۱۵-۵۶۵ nm) در حداقل زمان ممکن و به دور

سنجش میزان فعالیت آنزیم کاسپاز-۳: به منظور کمی نمودن میزان فعالیت کاسپاز-۳ در عصاره سلولهای تیمار شده با دارو در مقایسه با نمونه کنترل منفی، از کیت سنجش فعالیت کاسپاز-۳ استفاده شد. در این کیت از AC-DEVD-AFC به عنوان سوبسترای آنزیم کاسپاز-۳ استفاده گردید. آبکافت آنزیمی پیوند AFC-سوبسترا موجب رهاسازی AFC در آن و افزایش نشر در طول موج ۵۰۵ nm می‌گردد. میزان رنگ فلوروسنت ایجاد شده بر اثر شکست پروتئولیتیک سوبسترای کاسپاز، میزان فعالیت کاسپاز-۳ را در عصاره سلولی استخراج شده را نشان می‌دهد. در اینجا پس از شستشوی سلولهای برداشت شده از فلاسکهای سلولی، فروپاشی سلولها به منظور تهیه عصاره سلولی انجام شد. سپس با استفاده پلیت چندخانه مخصوص کیت، به چاهکهای مورد نظر ۱۰۰ µl از محلول آنتی کاسپاز-۳ اضافه و پس از انکوبه کردن به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۲۰۰ µl بافر blocking جهت مسدود کردن نقاط اتصال غیر اختصاصی چاهکها جایگزین شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، بافر مسدود کننده خارج و چاهکها سه بار با بافر انکوباسیون مورد شستشو قرار گرفت. به هریک از چاهکها ۱۰۰ µl از عصاره سلولی تهیه شده اضافه و پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، عصاره سلولی خارج و چاهکها سه بار با بافر انکوباسیون شسته شد. سپس ۱۰۰ µl از محلول سوبسترای تازه تهیه شده (AC-DEVD-AFC) به چاهک افزوده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. مایع رویی حاوی مقادیر مشخصی از سوبسترای برش خورده و AFC آزاد شده است و در نتیجه میزان فلوروسانس آن، معرف فعالیت آنزیم در عصاره سلولی می‌باشد. میزان فلوروسانس AFC آزاد شده توسط دستگاه فلورواسپکتروفلوئومتر، با تهیه نمونه در طول موج تحریکی ۴۰۰ نانومتر و طول موج نشری ۵۰۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی الگوی شکست نردبانی DNA: پس از اثردهی دارو بر سلولها و گذشت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، استخراج و تخلیص DNA به منظور بررسی الگوی نردبانی آن با استفاده از کیت Apoptotic DNA Ladder Kit انجام گرفت. اساس کارکرد این کیت بر اتصال اختصاصی مولکولهای DNA به glass fiber fleece در حضور نمک کائوتروپیک و گوانیدین هیدروکلراید استوار گشته است. روش انجام کار بر اساس دستور کار کیت به صورت زیر می‌باشد: تعداد 2×10^6 از سلولهای تیمار شده با دارو توسط بافر فروپاشاننده و اتصال یابنده به DNA، فروپاشانده و عصاره حاصل از فیبرهای شیشه‌ای مستقر در لوله سانتریفیوژ عبور داده شد. این بافر حاوی گوانیدین هیدروکلراید ۶M، اوره ۱۰mM، تریس هیدروکلراید ۱۰mM، Triton X-100 (۲۰ درصد حجم / حجم) با pH ۴/۴ می‌باشد. جداسازی اجزای سلولی از DNA متصل شده به فیبرها با انجام سانتریفیوژ در ۸۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه صورت گرفت و پس از شستشوی لوله سانتریفیوژ، DNA به کمک محلول نمکی ضعیف (تریس ۱۰mM با pH ۸/۵) استخراج و جمع آوری گردید. غلظت DNA با روش جذب خوانی تعیین شد و معادل ۳-۱۰ µM از آن به روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE انتقال یافت تا الکتروفورز آن به مدت ۱/۵ ساعت تحت ولتاژ ۷۵ ولت صورت پذیرد. در اینجا از عصاره سلولهای U937 تیمار شده با غلظت ۴ µg/ml از داروی کمپتوتسین (Camptothecin) به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. تیمار سلولها با این دارو موجب القاء آپوپتوز در حدود ۳۰ درصد می‌گردد که الگوی نردبانی DNA آن به روی ژل آگارز قابل مشاهده می‌باشد.

Real time RT-PCR: RNA با استفاده از کیت RNeasy Plus Mini Kit بر اساس دستورالعمل کیت استخراج شد. cDNA با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس (RevertAidTM M-MuLV) و پرایمرهای رندوم هگزامر ساخته شد. Real Time Quantitative RT-PCR با استفاده

درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه با استفاده از دستگاه Corbett Rotor-Gene 6000 انجام شد. آنالیز داده‌ها با کمک نرم افزار Corbett Rotor-Gene 6000 و به روش $\Delta\Delta C_T$ انجام شد. لیست و توالی پرایمرهای مورد استفاده که توسط شرکت TAG Copenhagen (دانمارک) تهیه شده در جدول ۱ آمده است.

از کیت QuantiFast™ SYBR Green PCR Master Mix طبق دستورالعمل کیت و بر اساس برنامه‌ی واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه و به دنبال آن ۴۰ سیکل مشتمل بر ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۰ ثانیه، توقف در دمای اتصال اختصاصی پرایمر برای مدت ۲۵ ثانیه و تامین زمان لازم برای عملکرد آنزیم در ۷۲

جدول ۱- توالی پرایمرها

ژن	توالی پرایمر
Akt1	پرایمر پیشرو: 5'-CCAGATGGAAAGACGTTTTTGTG-3' پرایمر پسرو: 5'-GAGAACAACACTGGATGAAATAAA-3'
*Akt2	پرایمر پیشرو: 5'-CTGCGGAAGGAAGTCATCATTC-3' پرایمر پسرو: 5'-CGGTCGTGGGTCTGGAAGGCATAC-3'
GAPDH	پرایمر پیشرو: 5'-CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAG-3' پرایمر پسرو: 5'-AGGGTCTCTCTCTTCTTCTTCTGTGCTCT-3'
mTOR	پرایمر پیشرو: 5'-TTTCCCCAAAACCTTCTGATGTGCC-3' پرایمر پسرو: 5'-CGGTGCTATGGACTGAATGCGAATG-3'
PTEN	پرایمر پیشرو: 5'-TGGCTAAGTGAAGATGACAATCATG-3' پرایمر پسرو: 5'-GCACATATCATTACACCAGTTCGT-3'
Atg5	پرایمر پیشرو: 5'-GTGAGATATGGTTTGAATATGAAGGC-3' پرایمر پسرو: 5'-CTCTTAAAAATGTACTGTGATGTTCCAA-3'

* با توجه به اینکه در سلول‌های T-47D واریانت Akt3 بیان نمی‌شود، لذا در اینجا بیان دو واریانت ۱ و ۲ بررسی شده است.

منظور تعیین رابطه اثر دارو با زمان، نمونه‌ها بعد از گذشت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محدوده غلظتی تعیین شده و میزان توان زیستی سلول‌ها پس از تیمار دارویی در قیاس با نمونه شاهد منفی محاسبه گردید. نمودار جذب نوری محلول فورمازان در حلال DMSO، که بر اساس غلظت‌های افزاینده دوکسوروبیسین و سدیم سولفاتیاژول و سدیم سولفاستامید رسم شده است (شکل ۱). نشان دهنده اثرات بازدارندگی وابسته به غلظت دارو در رشد و تکثیر سلول‌ها در محدوده غلظتی صفر تا 6×10^{-4} mM برای دوکسوروبیسین و محدوده غلظتی صفر تا ۵۰ mM برای سدیم سولفاتیاژول و سدیم سولفاستامید می‌باشد. در شکل ۱ ارتباط میزان توان زیستی سلول‌ها با افزایش غلظت دارو نشان داده شده است. با استفاده از این نمودار غلظت مؤثر دارو برای کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلول‌ها (LC_{50})

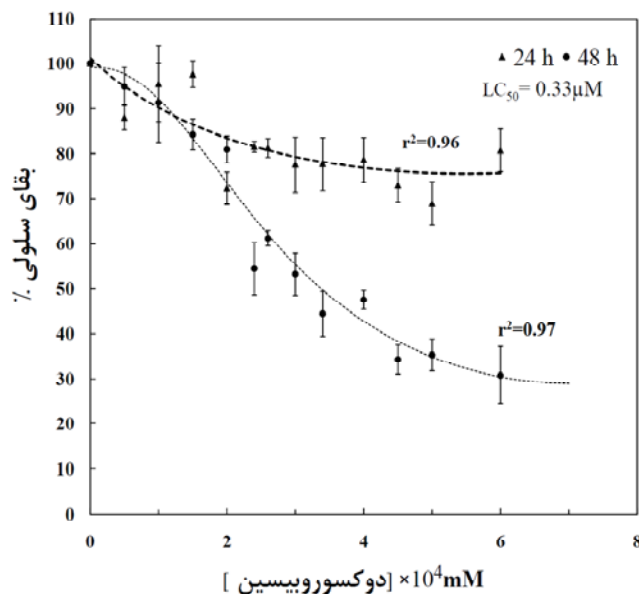
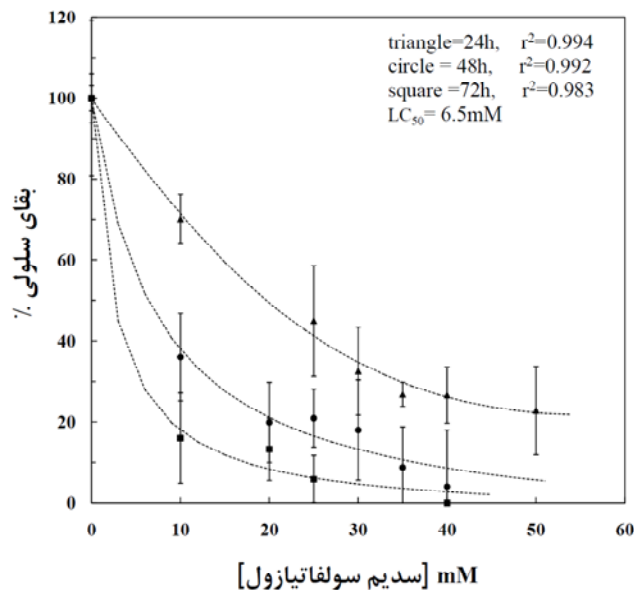
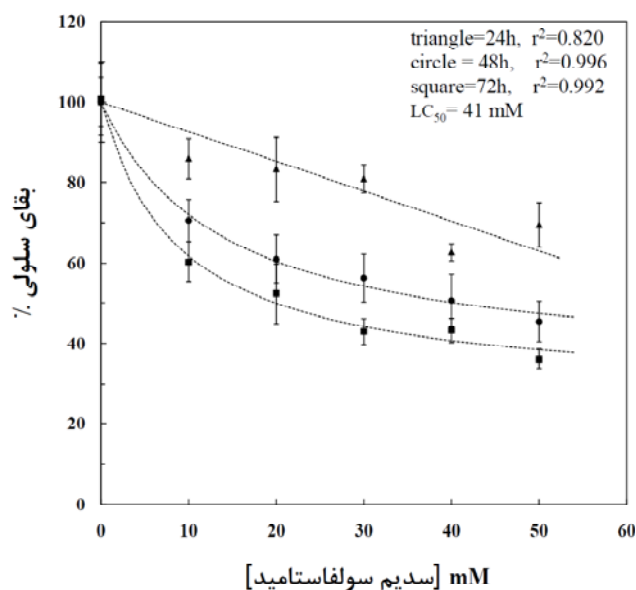
نرم افزارهای رایانه ای و تجزیه و تحلیلهای آماری: پردازش داده‌های فلوسیتومتری با استفاده از نرم افزار FloMax انجام و تجزیه و تحلیلهای آماری به منظور انجام آزمون آماری ANOVA یک طرفه (با توجه به توزیع نرمال داده‌ها) در سطح $p < 0.05$ با استفاده از نرم افزارهای SPSS16 و Excel 2007 صورت گرفت. پردازش داده‌های Real time RT PCR با استفاده از نرم افزار Rotor Gene 6000 به روش $\Delta\Delta C_T$ و آنالیز آماری آن با استفاده از نرم افزار SPSS16 به روش t-test در سطح معناداری $p < 0.05$ انجام شد.

نتایج

کاهش توان زیستی سلول‌های T-47D در حضور سدیم سولفاتیاژول، سدیم سولفاستامید و دوکسوروبیسین : به

۴۱ mM مشخص شده و در تمامی مطالعات انجام شده در این مقاله جهت تشخیص نوع اثر بازدارندگی دارو مورد استفاده قرار گرفته است.

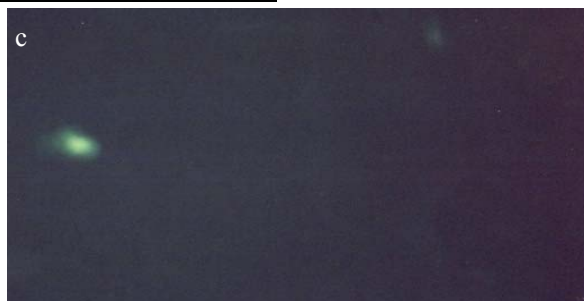
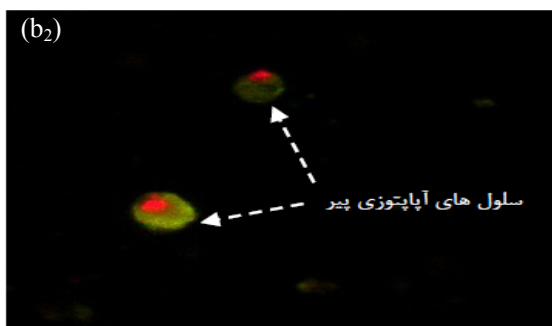
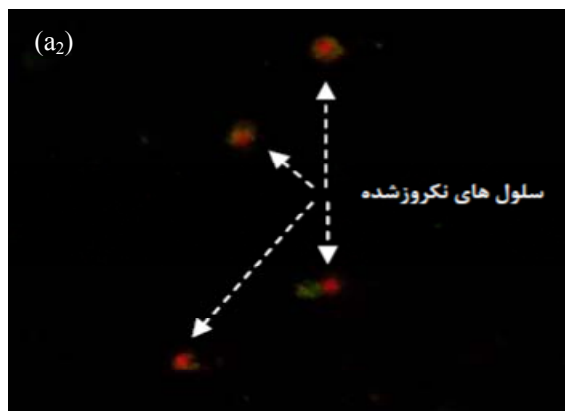
در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه و در ۴۸ ساعت برای دوکسوروبیسین، سدیم سولفاتiazول و سدیم سولفاستامید به ترتیب برابر با $0.33 \mu\text{M}$ ، $6/5 \text{ mM}$ و



شکل ۱- منحنی توان زیستی سلولهای T-47D برحسب افزایش غلظت دوکسوروبیسین، سدیم سولفاتiazول و سدیم سولفاستامید. درصد توان زیستی سلولها در مقایسه با نمونه کنترل منفی پس از تیمار با غلظتهای مختلف داروها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ برای سدیم سولفاستامید و سدیم سولفاتiazول و ۲۴ و ۴۸ ساعت برای دوکسوروبیسین محاسبه گردیده است. منحنی حاصل نشان دهنده اثر بازدارندگی دوکسوروبیسین، سدیم سولفاتiazول و سدیم سولفاستامید بر روی توان زیستی سلولها به صورت تابعی از غلظت و زمان می باشد. هریک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از حداقل سه آزمون مستقل $\pm$ خطای معیار می باشد.

غلظت LC_{50} و رنگ‌آمیزی با Annexin-PI، در یک جمعیت سلولی استقرار یافته در سطح لام، پیدایش علائم آپوپتوزی تنها در مورد تعداد بسیار کمی از سلولها در میکروسکوپ فلوروسنت مشاهده شد.

عدم مشاهده آپوپتوز یا نکروز در سلولهای T-47D تیمار شده با سدیم سولفاتiazول، سدیم سولفاستامید و دوکسوروبیسین در بررسی میکروسکوپ فلوروسنت و فلوسیتومتری: پس از تیمار دارویی سلولها با سدیم سولفاتiazول و سدیم سولفاستامید (به مدت ۴۸ ساعت در



شکل ۲- مشاهده ریخت شناسی سلولهای آپوپتوزی و نکروزی توسط میکروسکوپ فلوروسنت. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود پس از رنگ آمیزی همزمان سلولهای تیمار شده با PI و Annexin-FITC، سلولهای نکروزی با جذب PI، سلولهای آپوپتوزی جوان با Annexin-FITC و سلولهای آپوپتوزی پیر با هر دو ماده PI و Annexin-FITC رنگ می‌گیرند. تعداد سلولهای رنگ گرفته نسبت به مساحت میدان دید و در تکرارهای متعدد بسیار کم بوده است که علاوه بر تایید صحت کارکردی کیت Annexin-V-FITC در روش فلوسیتومتری (شکل ۳)، نشان دهنده درصد بسیار ناچیز بروز آپوپتوز در سلولهای تیمار شده با داروهای سدیم سولفاتiazول (a_1, a_2) سدیم سولفاستامید (b_1, b_2) می‌باشد. میدان دید میکروسکوپی برای نمونه شاهد منفی نیز در تصویر (c) نشان داده شده است.

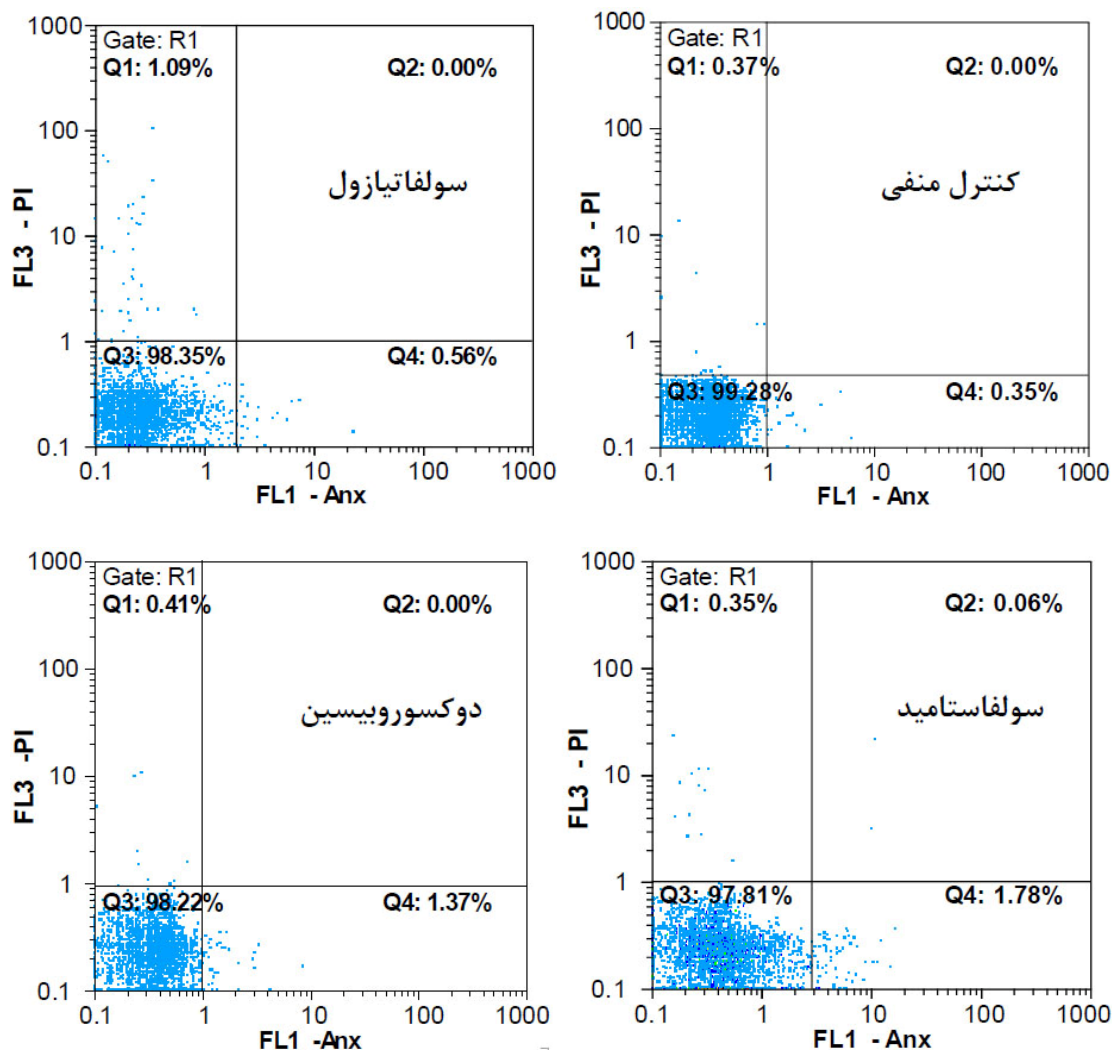
در طی آپوپتوز، سلولهای آپوپتوزی به علت سست شدن اتصالات بین سلولی با ماده زمینه‌ای، به شکل کروی مشاهده می‌شوند که به علت تظاهر فسفاتیدیل سرین‌های غشائی به روی سطح خارجی غشاء و رنگ‌آمیزی آن‌ها با Annexin-FITC به رنگ سبز درخشان درمی‌آیند (شکل ۲). در سلولهایی که در مراحل انتهایی آپوپتوز قرار دارند و یا نکروزه شده‌اند، نفوذ پذیری غشاء افزایش نشان می‌دهد و در نتیجه خصوصیت رنگ پذیری هسته با PI به علت تجمع رنگ قرمز در هسته تظاهر می‌یابد (شکل ۲).

از جمله تفاوت‌های مهم بین سلولهای آپوپتوزی پیر با سلولهای نکروزی عدم رنگ پذیری غشاء پلاسمایی در سلولهای نکروزی با رنگ Annexin-FITC است (شکل ۲a-b). بدیهی است که سلولهای زنده در میدان دید میکروسکوپ فلوروسنت به علت عدم رنگ پذیری با رنگهای فلوروسنت قابل تشخیص نمی‌باشند و تنها با استفاده از امکانات فاز کنتراست قابل رؤیت هستند (شکل ۲c).

به منظور دستیابی به مقادیر عددی القاء آپوپتوز و نکروز، آزمون فلوسیتومتری با نشانگرهای PI و Annexin-FITC انجام گرفت. سلولهای وارد شده به دستگاه فلوسیتومتر بر اساس اختلاف در میزان نشر رنگهای فلوروسین ایزوتیوسیانات (FITC) و پروپیدوم یدید (PI) که جذب سلول شده‌اند مورد تفکیک قرار گرفتند. در ابتدا در یک جمعیت سلولی فاقد رنگ، تعیین حدود اصلی سلولها (ناحیه R1) و حذف نقاط نامناسب با استفاده از منحنی دوبعدی (FSC) در برابر (SSC) صورت گرفت. در نمودار دوبعدی Annexin-FITC در برابر PI محاسبات مورد نظر با توجه به حدود اصلی جمعیت سلولی به روی چهار ناحیه‌ی اصلی Q1 تا Q4 انجام پذیرفت و درصد سلولهای سالم، آپوپتوزی و نکروزی مشخص گردید (شکل ۳). در اینجا با توجه به نوع نتیجه‌گیری موجود در اغلب منابع، مجموع درصد سلولهای قرار گرفته در نواحی Q2 و Q4 به

عنوان درصد کل وقوع آپوپتوز (سلولهای آپوپتوز شده پیر و جوان) در نظر گرفته شد (جدول ۲) (۸،۱۴،۳۴). در این حالت سلولهای قرار گرفته در نواحی Q1 و Q3 به ترتیب، معرف سلولهای نکروزی و سالم می‌باشد. در جدول ۲ به مجموع اعداد نواحی Q1 و Q2 نیز اشاره گردیده که در برخی از منابع به عنوان درصد کل وقوع نکروز مورد استناد قرار گرفته است (۶). بدیهی است که در چنین حالتی ناحیه Q4 به تنهایی درصد کل سلولهای آپوپتوزی را نشان خواهد داد. اشاره به هر دو روش محاسبه‌ای فوق از آنجا صورت گرفته است تا مشخص گردد محاسبه وقوع آپوپتوز و نکروز با توجه به هر کدام از دو روش فوق که صورت گیرد در حصول این نتیجه که درصد کل وقوع آپوپتوز و نکروز در زمان تیمار دارویی بسیار کم بوده است تأثیری را نخواهد داشت.

بررسی فلوسیتومتری نحوه تغییر توزیع فازهای چرخه سلولی در سلولهای T-47D تیمار شده با سدیم سولفاتiazول، سدیم سولفاستامید و دوکسوروبیسین : همان‌طور که در شکل ۴ و ۵ مشاهده می‌شود در نتیجه تیمار سلولها با دوکسوروبیسین تغییرات مشخصی در جابجایی پراکنش سلولها در مراحل مختلف چرخه سلولی مشاهده می‌شود که جابجایی سلولها از مرحله G1 به مرحله S (و به میزان کمتر به مرحله G2/M) می‌باشد. در حضور داروهای سدیم سولفاستامید و سدیم سولفاتiazول پراکنش سلولها به نسبت نمونه‌ی شاهد تغییرات محسوسی را ندارد و از این جهت نمی‌تواند کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلولی در زمان تیمار با این داروها را توجیه نماید. اما در مقابل، توقف چرخه‌ی سلولی در مرحله S (انتقال از G1 به S به میزان ۲۴ درصد) و G2 (انتقال از G1 به G2 به میزان ۱۲ درصد) در سلولهای تیمار شده با دوکسوروبیسین می‌تواند دلیل قانع کننده‌ای را در مورد سازوکار اثر این دارو در ممانعت از تکثیر سلولی ارائه نماید.



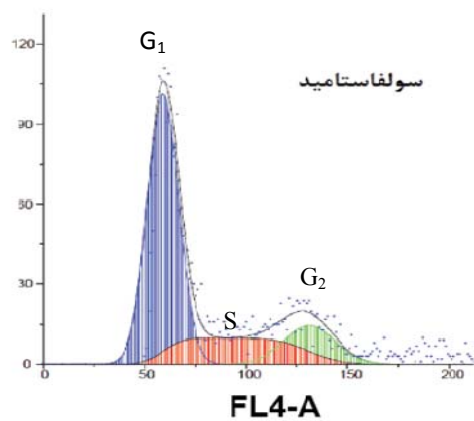
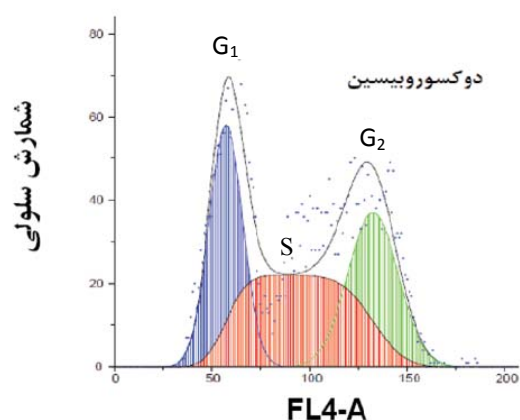
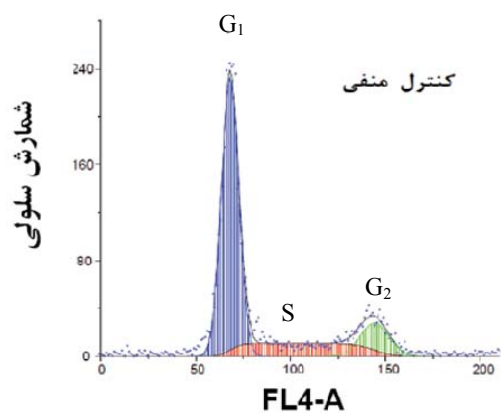
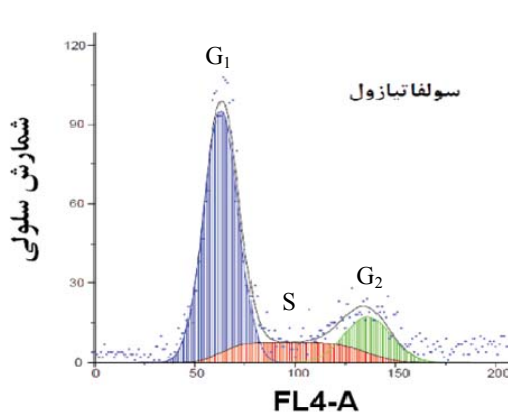
شکل ۳-الف) نمودار دویعدی Annexin-FITC علیه PI مربوط به یکی از تکرارهای آزمون فلوسیتومتری. نمودارهای دو بعدی حاصل از مطالعات فلوسیتومتری نشان می‌دهد که درصد سلولهای آپوپتوزی و نکروزی تفاوت فاحشی را با نمونه کنترل منفی (سلولهای تیمار نشده) ندارد. محدوده اندازه‌ی سلولهای مورد بررسی، روی نمودار FSC/SSC در نمونه سلولهای سالم فاقد رنگ و بر اساس اندازه‌ی طبیعی سلولها تعیین گردیده است.

این فرآیند در سلول است. بررسی تغییر فعالیت کاسپاز-۳ می‌تواند به عنوان نشانگر مهمی برای ورود سلولها به مسیر مرگ برنامه ریزی شده سلولی تلقی گردد و در آزمونهای سلولی جهت بررسی کمی اثر فعال کننده‌ها و مهار کننده‌های مرگ سلولی استفاده گردد (۲،۲۷).

افزایش فعالیت کاسپاز-۳ در سلولهای T-47D تیمار شده با سدیم سولفاتiazول، سدیم سولفاستامید و دوکسوروبیسین در مقایسه با کنترل منفی: کاسپاز-۳ یک آنزیم کلیدی است که در تمام مسیرهای فرآیند آپوپتوز فعالیت دارد و مسئول فعال و یا غیرفعال کردن طیف گسترده‌ای از زیست مولکولها و ایجاد خصوصیات ویژه

جدول ۲ - نتایج عددی آزمون فلوسیتومتری. نتایج مربوط به انواع سلولهای آپوپتوزی، نکروزی و سالم برای حداقل دو تکرار آزمایش به شکل درصد میانگین سلولها $\pm$ خطای معیار گزارش شده است. نواحی Q_1 ، Q_2 ، Q_3 و Q_4 و نیز Q_1+Q_2 و Q_2+Q_4 به ترتیب نشان دهنده نواحی (PI^+/Anx^-) ، (PI^+/Anx^+) ، (PI^-/Anx^-) ، (PI^-/Anx^+) و (PI^+/Anx^+) می باشند.

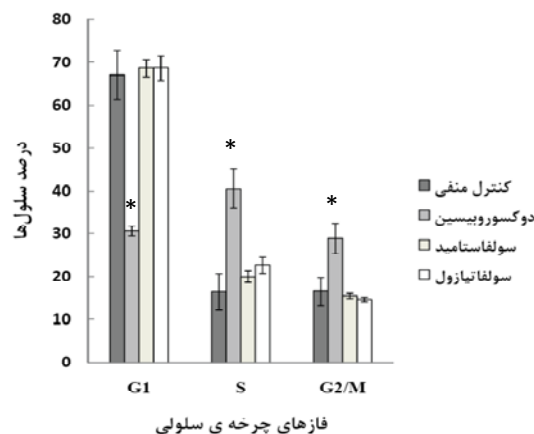
سلول های تیمار شده با داروها	Q_3	Q_1	Q_2	Q_4	Q_1+Q_2	Q_2+Q_4
کنترل منفی	$0.30 \pm 99/28$	0.19 ± 0.50	0.04 ± 0.06	0.07 ± 0.04	0.13 ± 0.53	0.11 ± 0.43
دوکسوروبیسین	$0.22 \pm 98/49$	0.1 ± 0.74	0.02 ± 0.03	0.11 ± 0.72	0.12 ± 0.76	0.31 ± 0.95
سولفاتiazول	$0.12 \pm 99/29$	0.007 ± 0.28	0.00 ± 0.00	0.127 ± 0.42	0.007 ± 0.128	0.127 ± 0.42
سولفاستامید	$0.28 \pm 99/79$	0.127 ± 0.44	0.014 ± 0.07	$0.12 \pm 1/69$	0.14 ± 0.51	$0.13 \pm 1/76$



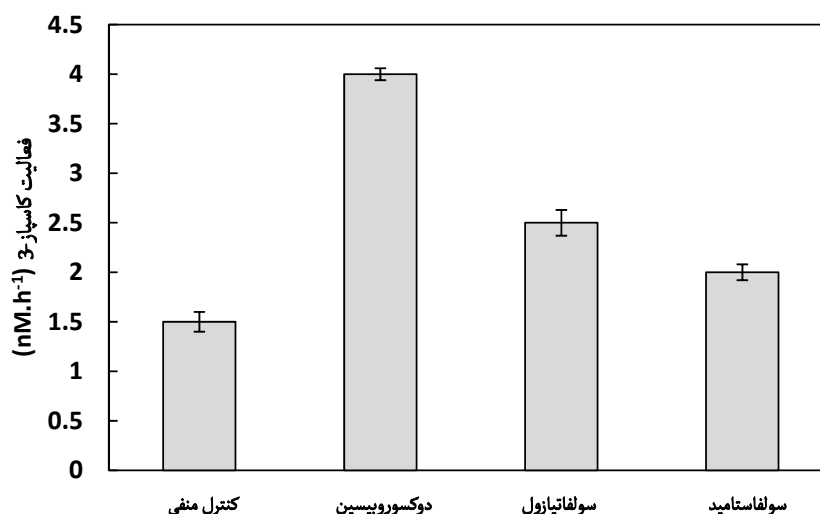
شکل ۴ - بافت نگار دویعدی چرخه سلولی در سلولهای T47-D با بهره گیری از روش فلوسیتومتری و رنگ آمیزی با DAPI. در این نمودار FL4-A نمایانگر سطح زیر منحنی علامت ثبت شده برای هر سلول رنگ شده با DAPI، در زمان عبور از مقابل پرتو لیزر می باشد. همان طور که در شکل مشاهده می شود، نواحی زنگوله ای مشخص شده از چپ به راست معرف درصد سلولهای موجود در فاز G_1 ، S و G_2/M می باشد.

و سدیم سولفاستامید نشان داده شده است. خطای معیار برای نمونه های ذکر شده نیز در روی شکل مشخص شده است. تفاوت معنادار در $p < 0.05$ نسبت به کنترل منفی با * مشخص شده است.

مقایسه میانگین میزان نشر فلئورسانس حاصل از سه بار تکرار در سلولهای تیمار شده با دوکسوروبیسین، سدیم سولفاتiazول و سدیم سولفاستامید در قیاس با نمونه شاهد منفی به ترتیب نمایانگر افزایش ۲/۸، ۲/۲ و ۱/۵ برابری فعالیت کاسپاز-۳ می باشد (شکل ۶). این افزایش نشر نمونه های تیمار شده با دارو به خودی خود نشان دهنده افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در زمان مجاورت سلولها با داروها می باشد.



شکل ۵- بافت نگار ستونی درصد سلولها علیه فازهای چرخه سلولی. درصد سلولهای موجود در سه فاز چرخه سلولی G_1 ، S، G_2/M در چهار نمونه کنترل منفی، دوکسوروبیسین، سدیم سولفاتiazول



شکل ۶- بافت نگار مربوط به فعالیت کاسپاز-۳. فعالیت آنزیمی در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد در عصاره سلولی استخراج شده از تعداد 2×10^6 سلول و بر اساس دستورالعمل کیت سنجیده شده و میزان نشر AFC آزاد شده توسط طیف نورسنج فلئورسانس اندازه گیری شده است. سطح معناداری تست آماری به کار رفته $p < 0.05$ می باشد.

(نکروزی) DNA بدون نظم مشخص و به صورت اتفاقی از نقاط مختلف شکسته می شود در حالی که در مراحل انتهایی فرآیند آپوپتوزی، بر اثر فعال شدن آنزیمهای اندونوکلاز درونی به وسیله کاسپازها، DNA کروموزومی از نواحی بین نوکلئوزومی بریده و قطعات یک و یا چند

عدم مشاهده قطعه قطعه شدن DNA در سلولهای T-47D تیمار شده با سدیم سولفاتiazول، سدیم سولفاستامید و دوکسوروبیسین در مقایسه با شاهد منفی و کنترل مثبت کیت: قطعه قطعه شدن DNA کروماتینی یکی از نشانه های وقوع مرگ سلولی است. در مرگ ناگهانی سلول

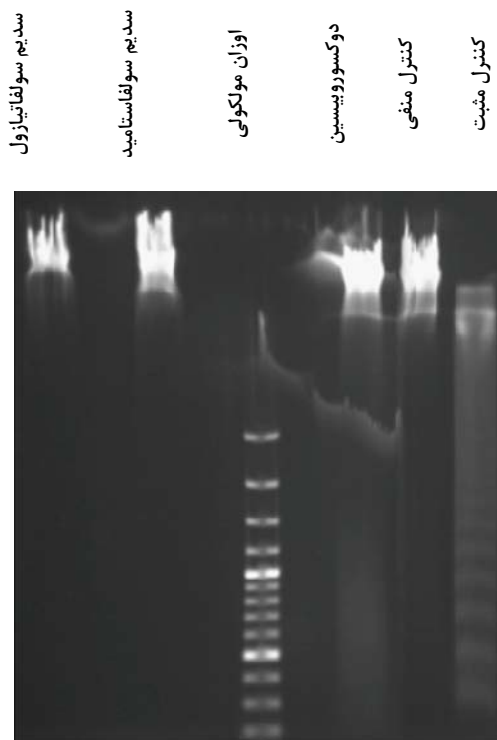
می‌شود. عدم ظهور الگوی نردبانی در نمونه تیمار شده با داروهای سولفونامیدی و در نمونه تیمار شده با دوکسوروبیسین حاکی از عدم وقوع و یا وقوع کم آپوپتوز می‌باشد. مشاهده الگوی نردبانی در نمونه کنترل مثبت کیت، صحت کارکرد کیت را نشان می‌دهد.

مطالعه‌ی مسیر بقاء سلولی در سلولهای T-47D در حضور سولفاتiazول و سولفاستامید: همان‌طور که در نمودار ۱ و جدول ۳ نشان داده شده است نتایج حاصل از Real time RT-PCR نشان دهنده افزایش بیان ژن PTEN و کاهش بیان ژنهای Akt1، Akt2 و mTOR در حضور سولفاتiazول می‌باشد. بدیهی است که افزایش بیان PTEN به عنوان فسفاتاز مهار کننده مسیر Akt می‌تواند باعث کاهش توان زیستی سلولها در حضور دارو گردد (۱۵). کاهش ارسال علائم بقاء سلولی از کاهش سطح بیان ژنهای Akt1، Akt2 و mTOR نیز قابل پیش بینی می‌باشد. از سوی دیگر با توجه به اشکال و اعداد آورده شده در نمودار ۱ و جدول ۳ مشخص می‌گردد که مسیر Akt با توجه به کاهش بیان PTEN و افزایش رونویسی Akt1، Akt2 و mTOR در حضور سولفاستامید تقویت شده است که از این منظر با کاهش مشخص توان زیستی سلولها در حضور این دارو مغایرت دارد. این موضوع در قسمت بحث با استناد بر راه اندازی مسیر اتوفاژی بقاء (cytoprotective autophagy) توضیح داده خواهد شد. استناد ما بر راه افتادن مسیر اتوفاژی از طریق بررسی سطح بیان ژن Atg5 به عنوان یکی از مهم‌ترین ژنهای دخیل در شکل گیری اتوفاگوزومها (۳۶) صورت گرفته و در نمودار ۱ و جدول ۳ نشان داده شده است.

بحث

طیف وسیع اثرات دارویی خانواده سولفونامیدها و گزارش‌های ضد و نقیضی که در مورد سازوکار اثرگذاری این داروها ارائه شده بود، در کنار نتایج به دست آمده از پژوهشهای قبلی مؤلفین در رابطه با نحوه اثرگذاری داروهای استازولامید و سولفابنزامید که سازوکار اثرگذاری

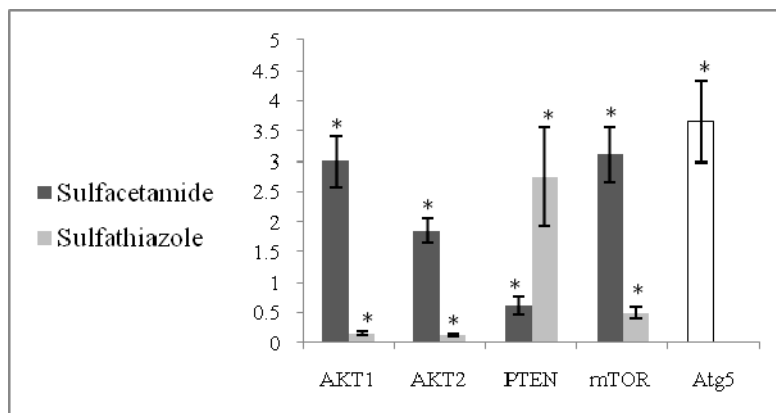
نوکلئوزومی ایجاد می‌گردد. در شکل (۷) از راست به چپ تصویر کنترل مثبت فراهم شده توسط کیت (از عصاره سلولهای U937 تیمار شده با غلظت $4 \mu\text{g/ml}$ از داروی کمپتوتسین که موجب القای آپوپتوز به میزان ۳۰ درصد می‌گردد)، کنترل منفی (سلولهای تیمار نشده)، سلولهای تیمار شده با دوکسوروبیسین، نمونه نردبان وزن‌های مولکولی، سلولهای تیمار شده با سدیم سولفاستامید و سدیم سولفاتiazول نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود به جز نمونه کنترل مثبت در سایر نمونه‌ها، الگوی شکست نردبانی DNA مشخص نمی‌باشد.



شکل ۷- الگوی شکست نردبانی DNA در سلولهای تیمار شده با سدیم سولفاستامید، سدیم سولفاتiazول و دوکسوروبیسین در مقایسه با شاهد منفی و کنترل مثبت کیت. از سمت راست به چپ تصویر الگوی سلولهای کنترل مثبت فراهم شده توسط کیت (از عصاره سلولهای U937 تیمار شده با غلظت $4 \mu\text{g/ml}$ از داروی کمپتوتسین)، کنترل منفی (سلولهای تیمار نشده)، سلولهای تیمار شده با دوکسوروبیسین، نمونه نردبان وزن‌های مولکولی، سلولهای تیمار شده با سدیم سولفاستامید و سلولهای تیمار شده با سدیم سولفاتiazول مشاهده

سدیم سولفاستامید) بر روی رده سلولی سرطان سینه (T-47D) پرداخته شود تا شاید از این طریق بتوان به سازوکار دقیق این گروه از داروها پی برد.

این دو دارو را از طریق مسیرهای ناشناخته‌ای به غیر از آپوپتوز و توقف چرخه سلولی مشخص نموده بود (۱،۲۳) تصمیم بر آن شد تا به بررسی قابلیت مهارکنندگی دو عضو دیگر از اعضای این خانواده دارویی (سدیم سولفاتiazول و



نمودار ۱- نتایج Real time RT PCR. تغییرات بیان ژنهای دخیل در فرآیند بقای سلولی با تکنیک Real time RT PCR بررسی گردید و داده‌ها به صورت میانگین عددی ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) حاصل از تکرارهای مختلف آزمایش به همراه خطای معیار نشان داده شده است. سطح معناداری تست آماری به کار رفته $p < 0.05$ می‌باشد که نمونه‌های دارای اختلاف معنادار نسبت به کنترل منفی با علامت * در نمودار ستونی نشان داده شده است. بررسی بیان ژن Atg5 فقط برای سلول‌های تیمار شده با سولفاستامید انجام شده است.

آپوپتوزی و یا نکروزی شده‌اند به شکلی که تنها جستجو در میدانهای دید مختلف در میکروسکوپ فلوروسنت می‌توانست تصاویر مناسبی را از سلولهای آپوپتوزی و یا نکروزی مشخص نماید (شکل ۲). به منظور دستیابی به مقادیر عددی القاء آپوپتوز و نکروز در نمونه‌های شاهد منفی (سلولهای تیمار نشده با دارو)، سلولهای تیمار شده با دوکسوروبیسین و دو داروی سولفونامیدی، آزمون فلوسیتومتری با نشانگرهای PI و AnnexinV-FITC انجام شد. نمودارهای دو بعدی حاصل از مطالعات فلوسیتومتری نشان داد که درصد سلولهای آپوپتوزی و نکروزی تفاوت فاحشی را با نمونه کنترل منفی (سلولهای تیمار نشده) ندارد (شکل ۳ و جدول ۲). عدم القاء آپوپتوز و یا نکروز حتی برای دارویی چون دوکسوروبیسین نیز مشاهده می‌گردید علی‌رغم آنکه با توجه به گزارشهای رسیده انتظار می‌رفت مقادیر بالایی از آپوپتوز در حضور این دارو راه‌اندازی شده باشد (۹،۱۹). توانایی القاء آپوپتوز در

جدول ۳- نتایج عددی Real time RT PCR

ژن	خطای معیار $\pm$	میانگین $2^{-\Delta\Delta Ct}$
سولفاستامید		
Akt1	0.15 ± 0.03	2.99 ± 0.42
Akt2	0.12 ± 0.02	1.85 ± 0.19
PTEN	2.73 ± 0.18	0.61 ± 0.14
mTOR	0.49 ± 0.09	3.11 ± 0.44
Atg5	---	3.66 ± 0.68

این تحقیق با توجه به آزمون MTT شاهد کاهش ۵۰ درصدی تعداد سلولها بعد از تیمار دارویی ۴۸ ساعته گردید (شکل ۱). اولین حدس در این خصوص، القاء آپوپتوز به عنوان عامل اصلی مرگ سلولی در زمان تیمار دارویی و کاهش درصد سلولها در حضور سدیم سولفاتiazول، سدیم سولفاستامید و دوکسوروبیسین بود. تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلوروسنت نشان داد که این دو دارو به میزان کمی سبب شکل‌گیری سلولهای

سلولهای سرطانی T-47D را می‌توان از طریق سنجش میزان فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ نیز مورد بررسی قرار داد. مطالعات ما نشان می‌داد که افزایش مشخصی در سنجش میزان فعالیت کاسپاز-۳ وجود داشته است که به ظاهر مؤید به راه افتادن مسیرهای آپوپتوزی در سلولهای سرطانی T-47D در حضور سولفاستامید، سولفاتازول و یا دوکسوروبیسین می‌باشد (شکل ۶). اگرچه در اغلب موارد فعال شدن کاسپازها و متعاقباً سوبستراهای پایین دست با شکسته شدن DNA ژنومی از نواحی بین نوکلئوزومی و شکل‌گیری الگوی نردبانی همراه است (۲۶)، اما این موضوع در بررسیهای این تحقیق مشاهده نشد (شکل ۷). در اینجا، الگوی نردبانی مشخص حاصل از نمونه کنترل مثبت کیت، صحت انجام روش را در مورد سایر نمونه‌ها ثابت می‌کرد و از این لحاظ بدون هیچ گونه شبهه‌ای عدم بروز شکست نردبانی DNA ژنومی را علی‌رغم افزایش فعالیت کاسپاز-۳ مورد تایید قرار می‌داد. در این راستا، افزایش مشاهده شده فعالیت آنزیمی کاسپاز-۳ را (شکل ۶) می‌توان با توجه به وجود نقص در فرایندهای مولکولی پایین دست کاسپاز-۳ از جمله عدم کارکرد درست DFF40 توضیح داد. این بدان معناست که علی‌رغم ثبت فعالیت آنزیمی کاسپاز-۳ در شرایط آزمایشگاهی (که در زمان مجاورت با سوبسترای مصنوعی و نه DFF40 ثبت شده است)، در شرایط طبیعی سلول که این آنزیم می‌بایست به روی سوبستراهای طبیعی خود (مانند DFF40) اثرگذار باشد این اثرگذاری احتمالاً با توجه به وجود نقص در ساختار سوبسترا(ها)ی طبیعی (مانند DFF40) در سلول مشاهده نمی‌گردد و لذا بواسطه عدم فعال سازی DFF40 تجزیه‌ی DNA و ظهور الگوی شکست نردبانی نیز مشاهده نمی‌گردد (شکل ۷).

نتایج حاصل از فلوسیتومتری و آزمون DNA laddering هم راستا با نتایج میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که آپوپتوز در زمان تیمار دارویی به میزان قابل توجهی القاء نشده است (شکل های ۷، ۳، ۲). لذا در اینجا، به منظور

توضیح کاهش ۵۰ درصدی تعداد سلولهای تیمار شده با داروهای سولفونامیدی و دوکسوروبیسین فرآیند توقف سلولها در یکی از فازهای چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفت. بررسیهای فلوسیتومتری با استفاده از نشانگر نئرزای DAPI نشان داد که تیمار سلولی با داروهای سولفونامیدی تغییر محسوسی را در پراکنش سلولها در فازهای مختلف چرخه سلولی در مقایسه با شاهد منفی به همراه ندارد (شکل ۴ و ۵). این در حالی بود که تیمار سلولها با دوکسوروبیسین جابه جایی مشخصی از سلولها را از مرحله G_1 به مراحل S (معادل با ۲۴ درصد) و G_2 (معادل با ۱۲ درصد) مجموعاً به میزان ۳۶ درصد نشان می‌داد. همان طور که در مقدمه ذکر شد دوکسوروبیسین در DNA دورشته ای نفوذ می‌کند و باعث مهار RNA و DNA پلیمراز وابسته به DNA می‌شود و در نتیجه مهار ساخت RNA و DNA را در پی دارد (۲۲). از طرفی این دارو با مهار کارکرد آنزیم توپوایزومراز II و باقی ماندن تنش توپولوژی DNA در زمان همانندسازی موجب مهار ساخت DNA و در نتیجه توقف در فاز S می‌گردد (۲۲). مطالعات انجام شده در این تحقیق نیز توقف چرخه سلولها در فاز S را در حضور دوکسوروبیسین تایید می‌نمود و به علاوه نشان می‌داد که دوکسوروبیسین توانایی آن را دارد که علاوه بر توقف در فاز S با اثرگذاری به روی عوامل مؤثر در کنترل چرخه سلولی در فاز G_2 مدت زمان استقرار سلولها را در فاز G_2 و در نتیجه مدت زمان لازم برای تقسیم سلولی را افزایش دهد (شکل ۴ و ۵). این کار احتمالاً با از کار انداختن فسفاتازی چون Cdc25 به عنوان عامل اصلی برداشت فسفات مهاري از روی کمپلکس CyclinB/Cdc2 و در نتیجه مهار این کمپلکس روی می‌هد.

برخی از گزارشها وجود جهش را در برخی از سلولهای سرطان سینه گزارش و علت سرطانی شدن را به فعالیت لگام گسیخته محور Akt نسبت داده‌اند (۴، ۱۸). بنابراین یکی از احتمالات در رابطه با نحوه اثرگذاری داروهای

انتخابی در این پژوهش می‌تواند تحریک رونویسی از ژن PTEN و یا مهار محور Akt از طریق کاهش سطح بیان ژنهای Akt1، Akt2 و mTOR قلمداد گردد. همان‌طور که در نمودار ۱ و جدول ۳ نشان داده شده است در ارتباط با مسیر سلولی فعال شده در سلول‌های تیمار شده با سولفاتایزول، کاهش سطح نسخه برداری از ژنهای Akt1، Akt2 و mTOR و افزایش نسخه برداری از ژن PTEN (فسفاتاز مهار کننده مسیر Akt (۱۵)) بیانگر کاهش ارسال علائم بقاء سلولی می‌باشد. بدیهی است که در چنین وضعیتی، توان زیستی سلولهای تیمار شده در حضور سولفاتایزول در مقایسه با سلولهای تیمار نشده (کنترل منفی) کاهش می‌یابد. لذا کاهش توان زیستی سلول‌ها در حضور سولفاتایزول و بروز اثرات ضد سرطانی آن نیازی به اثرگذاری به روی فرآیندهایی مانند آپوپتوز و یا توقف چرخه سلولی را نخواهد داشت. جالب است که در ارتباط با سلولهای تیمار شده با سولفاتاستامید نتایج فوق مبنی بر مهار محور Akt حاصل نشد (جدول ۳). اما این دارو قادر است تا از طریق دیگری مانند افزایش زمان لازم برای طی شدن تمامی مراحل چرخه سلولی (و نه یکی از مراحل خاص در چرخه سلولی نظیر آنچه در شکل معمول توقف چرخه سلولی مشاهده می‌شود) باعث کاهش سرعت تقسیم سلولها گردد. این کار از طریق راه اندازی مسیر اتوفاژی امکان پذیر است که در آن با خورده شدن اندامکهای نظیر میتوکندری و کاهش میزان تولید انرژی همه فعالیت‌های سلولی از جمله چرخه سلولی دچار افت سرعت می‌گردند (۵). اتوفاژی فرآیندی است که به طور طبیعی در زمان بروز یک تنش در محیط سلول (مانند تنش

دارویی در اینجا) روی می‌دهد تا حیات سلول را از طریق کاهش سرعت انجام فرایندهای سلولی (از جمله تقسیم سلولی) و افزایش توان زیستی سلولها (افزایش توان زیستی را در اینجا که به دلیل فعالیت مسیر Akt حاصل شده است را نباید با کاهش توان زیستی در آزمون MTT که به علت کاهش سرعت تقسیم سلولی ایجاد شده اشتباه گرفت) تضمین نماید. به این نوع اتوفاژی cytoprotective autophagy یا اتوفاژی بقاء اطلاق می‌گردد (۵). به منظور اثبات به راه افتادن مسیر اتوفاژی در حضور سولفاتاستامید، میزان بیان ژن Atg5 با روش Real time RT-PCR مورد سنجش قرار گرفت و افزایش ۳/۵ برابری آن در قیاس با شاهد منفی دقیقاً افزایش فعالیت این مسیر سلولی را در زمان تیمار سلولها با داروی سولفاتاستامید نشان می‌دهد (نمودار ۱ و جدول ۳).

بنابراین در کل می‌توان گفت که سازوکار اثرگذاری داروی سولفاتایزول مهار مسیر Akt (کاهش توان زیستی سلولها) و سازوکار اثرگذاری داروی سولفاتاستامید راه اندازی مسیر اتوفاژی بقاء (کاهش سرعت تقسیم سولی) می‌باشد که هر دوی این سازوکارها در نهایت باعث کاهش تعداد سلولهای T-47D در زمان حضور دارو (در قیاس با جمعیت سلولی شاهد منفی) می‌شود.

تقدیر و تشکر

اعتبارات این کار توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) و حوزه پژوهشی دانشگاه تهران فراهم شده است که بدین وسیله مراتب تشکر مؤلفین از این دو نهاد اعلام می‌گردد.

منابع

1. Abdolmohammadi MH, Farahnak, S. Mohammadpour R, Safarian S. (2011) Study of the inhibitory effects of sodium sulfabenzamide on the growth and proliferation of T-47D cells with emphasis on apoptosis and cell cycle arrest. *Journal of Qom University of Medical Sciences*. 5(1): 61-74.
2. Alnemri ES. (1997) Mammalian cell death proteases: A family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J. Cell Biochem*. 64(1): 33-42.
3. Bar-On, Ortal a; Shapira, Ma'anit a; Hershko, Dan D. a b.(2007) Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and

- Skp2 expression in breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* 18(10):1113-1121.
4. Chau NM, Ashcroft M. (2004) Akt2: a role in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 6(1):55-57.
 5. Chen N, Debnath J. (2010) Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett.* 584(7):1427-35.
 6. Davis JW, Melendez K, Salas VM, Lauer FT, Burchiel SW. (2000) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits growth factor withdrawal-induced apoptosis in the human mammary epithelial cell line, MCF-10A. *Carcinogenesis* 21(5):881-886
 7. Dolak TM, Lever OW, Marsh D, Moran I, Sutton S. (1999) Ophthalmological preparation 18, p: 129.
 8. Dowejko A, Bauer RJ, Muller-Richter UDA, Reichert TE. (2009) The human homolog of the Drosophila headcase protein slows down cell division of head and neck cancer cells. *Carcinogenesis* 30(10):1678-1685.
 9. Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, et al. (2005) Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 24(30):4765-4777.
 10. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148(7):2207-2216.
 11. Fukuoka K, Usuda J, Iwamoto Y, Fukumoto H, Nakamura T, Yoneda T, et al. (2001) Mechanisms of action of the novel sulfonamide anticancer agents E7070 on cell cycle progression in human non-small cell lung cancer cells. *Invest. New Drugs* 19(3):219-227.
 12. Gennaro AR. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. Mach Publishing Co., Eston, Pennsylvania, pp: 1174-1180.
 13. Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Marie JC, Braut-Boucher F, Daniel F, et al. (2006) Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27(9):1812-1827.
 14. Hsu CL, Yen GC. (2006) Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 50(11):1072-1079.
 15. Jaclyn L, Gideon MB, Wendy BB, and Phillip ADS. (2008) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist. Updat.* 11(1-2): 32-50.
 16. Javidannejad S, Hajibabaei M. (2001) Clinical information for Generic Drugs of Iran, 1st ed., University Sciences Publishing Co., Tehran, pp: 648-655.
 17. Javidannejad S, Hadjibabaei M. (2001) Medical Drugs Information: Generic Drugs of Iran. Tehran University Press, p. 648-655, [Text in Persian].
 18. Jhaveri MS, Rait AS, Chung KN, Trepel JB, Chang EH. (2004) Antisense oligonucleotides targeted to the human A folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment. *Mol. Cancer Ther.* 3(12):1505-1512.
 19. Kim J, Freeman MR. (2003) JNK/SAPK mediates doxorubicin-induced differentiation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 79(3): 321-328.
 20. LaPensee EW, Schwemberger SJ, LaPensee CR, Bahassi E, Afton SE, Ben-Jonathan N. (2009) Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase. *Carcinogenesis* 30(8):1298-1304.
 21. Liao DC. (2003) Management of acne. *J. Fam. Pract.* 52(1):43-51
 22. Lown JW. (1993) Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacol. Ther.* 60 (2): 185-214.
 23. Mohammadpour R, Safarian S, Abdolmohammadi MH. (2011) Study of the effects of aceazolamide in decreasing viability of the breast cancer cells in T-47D cell line. *Journal of Science of University of Tehran* 36(2):29-41.
 24. Mohammadzade N. (2001) Handbook of drugs and medicine for families, 2nd ed., Mazayer Publishing Co., Tehran, p: 92.
 25. Mohan R, Banerjee M, Ray A, Manna T, Wilson L, Owa T, et al. (2006) Antimitotic sulfonamides Inhibit microtubule assembly dynamics and cancer cell proliferation. *Biochemistry* 45(17):5440-5449.
 26. Nagata S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256(1):12-18.
 27. Nicholson DW, Thornberry NA. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 22(8):299-306.
 28. Owa T, Yoshino H, Okauchi T, Yoshimatsu K, Ozawa Y, Sugi NH, et al. (1999) Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G₁ phase of the cell cycle. *J. Med. Chem.* 42(19):3789-3799.

29. Ozawa Y, Sugi NH, Nagasu T, Owa T, Watanabe T, Koyanagi N, *et al.* (2001) E7070, a novel sulfonamide agent with potent antitumor activity in vitro and in vivo. *Eur. J. Cancer* 37(17):2275-2282.
30. Ruggy GH. (1946) Recent advances in pharmacology and materia medica. *Ohio. J. Sci.* 46(4) 208-210.
31. Saltiel E, McGuire W. (1983) Doxorubicin (Adriamycin) Cardiomyopathy-A Critical Review. *West J. Med.* 139(3): 332-341.
32. Seydel JK. (1968) Sulfonamides, structure-activity relationship, and mode of action. Structural problems of the antibacterial action of 4-aminobenzoic acid (PABA) antagonists. *J. Pharm. Sci.* 57(9):1455-1478.
33. Supuran CT, Casini A, Scozzafava A. (2003) Protease inhibitors of the sulfonamide Type: Anticancer, Anti-inflammatory and Antiviral Agents. *Med. Res. Rev.* 23(5):535-558.
34. Tyagi A, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. (2006) Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase-mediated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder transitional-cell papilloma RT4 cells: evidence for a regulatory loop between p53 and caspase 2. *Carcinogenesis* 27(11):2269-2280.
35. Van Hoogdalem EJ. (1998) Transdermal absorption of topical anti-acne agents in man; review of clinical pharmacokinetic data. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol* 11(1):13-19.
36. Yousefi S, Simon HU. (2009) Autophagy in cancer and chemotherapy. *Results Probl. Cell Differ.* 49:183-90.

Cellular Effects of Antibacterial Drugs, Sulfathiazole and Sulfacetamide, on a Breast Cancer Cell line (T-47D)

Mohammadpour R., Safarian S., Norouzi S. and Razazan A.

Cell and Molecular Biology Dept., School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Primary anti-bacterial drugs, called sulfonamide drugs, have several biological effects driven widespread use of these drugs in medicine. Here, with respect to some reports (confirming anti-cancerous activity of some sulfadugs) cellular effects of two antibacterial sulfonamides (sulfathiazole and sulfacetamide) on T-47D cells was studied using several experimental methods. The fifty percent reduction in cell viability (LC₅₀) was investigated after 48 h treatment of T-47D cells with sodium sulfathiazole and sodium sulfacetamide. Cells undergoing apoptosis were identified using fluorescent microscopy after double staining with Annexin-PI fluorochromes. Flow cytometric analysis, using Annexin-V-Fluores kit, revealed lack of apoptosis among the treated cells. This notion was also exhibited by DNA laddering investigations while increasing in caspases-3 activity was registered. Cell cycle analysis after DAPI treatment indicated lack of cell cycle arrest among the treated cells. Here, doxorubicin was utilized as a positive control in all experiments. On the whole, regarding to the present study, it has been exhibited that in the presence of sodium sulfathiazole, decreased transcriptional expression level of Akt1, Akt2 and mTOR genes, in parallel with increased transcriptional level of PTEN gene, is being followed by reducing of cell viability. No similar mechanism was observed for sodium sulfacetamide. With respect to increased transcriptional expression level of Atg5, Akt1, Akt2 and mTOR genes, in parallel with decreased transcription level of PTEN gene, mechanism of action of sodium sulfacetamide should be exerted by cytoprotective autophagy causing decreasing of cell division or growth rate.

Keywords: Sulfathiazole, Sulfacetamide, Breast cancer, Apoptosis, Cell cycle arrest, Autophagy