

## سمیت سلولی سیس پلاتین در خط سلول سرطانی

### تخمندان هامستر چینی (CHO)

دکتر سید فرشاد مسینی شیرازی<sup>۱</sup>، معصومه افتخاری<sup>۲</sup>

#### خلاصه

**سابقه و هدف:** سیس پلاتین یکی از متداولترین داروها در شیمی درمان سرطان است. این دارو در درمان سرطان پیشرفته بیضه، سرطان پیشرفته تخمدان، سرطان مثانه، سرگردن، سرطان ریه و در برخی از انواع نئوپلاسم کودکان کاربرد درمانی داشته است. کشت سلولی از جمله روش‌های مناسب برای بررسی تاثیر داروها در روند رشد سلولها، به خصوص سلولهای سرطانی است. در این پژوهش به منظور بررسی تاثیر سیس پلاتین بر روند رشد سلولهای سرطانی، پس از کشت سلولهای سرطان تخمدان در محیط آزمایشگاه، به مقایسه کیتیک رشد این سلولها در گروه شاهد با گروه تحت تاثیر داروی سیس پلاتین پرداختیم.

**مواد و روش‌ها:** این پژوهش به صورت تجربی بوده و در آن از روش‌های متداول کشت سلول استفاده شده است. سلولهای سرطان تخمدان هامستر چینی (CHO) در محیط کشت DMEM/F12 و در فضای انکوباتور مرطوب  $37^{\circ}\text{C}$  به همراه  $5\% \text{CO}_2$  رشد داده شد. آنگاه با رسم منحنی رشد مربوطه، پارامترهای رشد این سلولها مورد بررسی قرار گرفتند. گروه دیگری از همین سلولها و در شرایط رشد مشابه برای مدت یک ساعت با بالاترین غلظتی از سیس پلاتین که از روند دوز - پاسخ تبعیت می‌کرده است، برخورد داده شده و پارامترهای رشد آنها نیز مورد بررسی و با گروه شاهد مقایسه شده است. به منظور بررسی کمی سمیت سلولی سیس پلاتین بر سلولهای سرطان تخمدان CHO از روش شمارش تعداد کلنی در گروه شاهد و همچنین گروههای متاثر از غلظت‌های گوناگون سیس پلاتین استفاده شده است. بررسی‌های آماری و رسم نمودارهای مربوطه با استفاده از برنامه رایانه‌ای Prism ویرایش چهارم صورت گرفته است.

**یافته‌ها:** رشد سلولهای سرطان تخمدان CHO از قانون عمومی رشد سلولها در فازهای لگاریتمی و ثابت پیروی می‌کند. بر این مبنای زمان دو برابر شدن این سلولها در این شرایط رشد  $18/26 \pm 2/6$  ساعت تعیین شد. سمیت سیس پلاتین بروی این سلولها تا غلظت  $1 \mu\text{g/ml}$  از روند دوز - پاسخ تبعیت کرده و پس از آن به حالت صاف می‌رسد، به ترتیبی که افزایش مقدار بیشتر دوز، تاثیری در سمیت سلولی ندارد. برخورد سلولها با این غلظت نشانگر کاهش نسبت کاشت سلولهای سرطان تخمدان CHO به میزان  $37\%$  شده است ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری و توصیه‌ها:** رشد سلولهای سرطان تخمدان پس از برخورد با سیس پلاتین در همه مراحل نسبت کاشت، رشد لگاریتمی و مرحله صاف تحت تاثیر قرار می‌گیرد. نحوه تاثیر سیس پلاتین بر روند رشد این سلولها به گونه‌ای است که با اهمیت‌ترین مرحله تاثیر بر نسبت کاشت سلولهاست که برای اولین بار در این پژوهش به آن پی برده شده است و امکان بکارگیری این دارو برای جلوگیری از لانه‌گزینی سلولهای سرطانی و در پی آن تومورهای ثانویه را پیشنهاد می‌کند. همچنین بر اساس نتایج، هرچند سیس پلاتین در محدوده متناسب با کاربرد بالینی آن روند دوز - پاسخ خوبی را نشان می‌دهد، لیکن برای اولین بار نشان داده شده است که این روند در سلولهای سرطان تخمدان هامستر چینی طیف محدودی داشته و در غلظت‌های بالاتر از  $1 \mu\text{g/ml}$  از تاثیر آن کاسته می‌شود. بررسی مقایسه‌ای این پدیده‌ها در سلولهای دیگر و همچنین انجام پژوهش‌های دقیق‌تر در برای یافتن دلایل این مشاهدات پیشنهاد می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** سلول تخمدان هامستر چینی (CHO)، سمیت سلولی، سیس پلاتین، سنجش تعداد کلنی.

<sup>۱</sup> دانشیار، گروه سم شناسی/داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۲</sup> محقق، دانشیار، گروه سم شناسی/داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

## مقدمه

سیس پلاتین یکی از متداولترین داروها در شیمی درمانی سرطان است. این دارو در درمان ۸۵٪ بیماران با سرطان پیشرفته بیضه علاج بخش بوده است (۱). کاربرد این دارو در سرطان پیشرفته تخمدان، سرطان مثانه، سروگردن، سرطان ریه (Nonsmall cell lung carcinoma) و در برخی از انواع نئوپلاسم کودکان منجر به پاسخ معنی دار درمانی شده است. از دیگر کاربردهای بالینی این دارو نقشی است که در افزایش اثر پرتو درمانی دارد (۲،۳).

مکانیسم اثر سمیت سلولی سیس پلاتین را اساساً به اتصال آن بر زنجیره اسیدهای نوکلئیک هسته سلول (DNA adducts) مرتبط دانسته اند (۴). علاوه بر این اتصال سیس پلاتین به دیگر اجزاء سلولی چون پروتئین‌ها و برخی از آنزیم‌های داخل سلولی نیز نشان داده شده است (۵-۷).

آلوپسی، سسکه، تشنج، کاهش اشتها، تهوع و استفراغ، نارسایی کلیوی و سمیت گوشی از جمله عوارض این دارو بوده که از این میان عوارض کلیوی و گوشی از عوامل با اهمیت در کاهش دوز مصرفی دارو هستند (۸). استفاده از کشت سلول‌های سرطانی برای بررسی اثر و سمیت داروها روز به روز گسترش می‌یابد. از آنجا که مطالعه یک سلول در درون یک ارگانیسم چند سلولی امری غیر قابل دسترسی بوده و بررسی تغییرات سلولی در اثر داروها و مواد شیمیایی آسان نیست، رشد سلول در محیط کشت روش جایگزین مناسبی برای بررسی آسان‌تر و مشاهده مستقیم تغییرات سلولی و همچنین کنترل روند انجام آزمایش بوده و بسیار مورد استفاده قرار گرفته است (۹-۱۱).

پارامترهای مربوط به کینتیک رشد سلولها و تاثیر مواد بر بیولوژی سلولی چون تغییرات رشد سلول در مراحل لگاریتمی و یا زمان رشد ثابت جمعیت سلولی، شیب مراحل گوناگون منحنی رشد سلول، مدت زمان دوبله شدن، نسبت کاشت سلول‌های شاهد به سلول‌های برخوردار یافته با دارو و یا مواد شیمیایی، تعیین غلظت‌های موثر در اندیکس‌های ۹۰، ۵۰ و یا ۲۵ و بالاخره تاثیر کلی بر سلامت و رشد، یا مرگ سلول‌های سرطانی از جمله مطالعاتی است که در خصوص تاثیر داروها و مواد شیمیایی و یا اشعه‌های فیزیکی در محیط کشت سلولی ممکن است.

از محدود محققینی که به بررسی کینتیک زیست سلول‌های سرطان تخمدان در مجاورت سیس پلاتین پرداخته‌اند، Gibb و همکارانش می‌باشند که به بررسی کینتیک القای آپوپتوز توسط سیس پلاتین در سلول‌های سرطان تخمدان نظر داشته است (۱۲). باید توجه داشت که

درواقع آنچه این گروه از محققین به آن پرداخته‌اند، کینتیک مرگ و نه کینتیک رشد و زندگی سلولها بوده است که در طی فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده روی داده است. در مطالعه حاضر به بررسی کینتیک رشد سلول‌های سرطان تخمدان هامستر چینی (CHO) به عنوان یک مدل آزمایشگاهی کشت سلولی در غیاب و حضور سیس پلاتین پرداختیم. بدین ترتیب با بررسی فاکتورهای رشد، تاثیر سمیت (و نه کشندگی) سیس پلاتین بر رشد و حیات سلول‌های سرطان تخمدان مورد بررسی قرار گرفته است. طبیعتاً از آنجا که مرگ سلولی یکی از تبعات استفاده از سیس پلاتین بر سلولهاست، مقیاسهای فارماکولوژیک این اثر (چون بررسی غلظت کشنده بر نیمی از جمعیت سلولی: LD50) نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند. مطالعه تاثیر سیس پلاتین بر نسبت کاشت، نسبت رشد، سرعت رشد و تکثیر و اندیکس‌های غلظتی مربوطه، بینش بهتری برای نحوه و زمان کاربرد این دارو در برنامه‌های شیمی درمانی حاصل خواهد کرد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق به روش تجربی و بروی مدل کشت سلولی در آزمایشگاه انجام گرفته است.

### روش اجرا

پس از جمع‌آوری سلول‌ها به کمک تریپسیناسیون، تعداد ۳۰/۰۰۰ سلول در خانه‌های پلیت‌های کشت ۱۲ خانه‌ای کاشته شد. نیمی از این کشت‌های سلولی به عنوان شاهد و نیمی دیگر به مدت یک ساعت با غلظت‌های گوناگون سیس پلاتین برخورد، کردند. پس از یک ساعت برخورد محیط کشت دارای سیس پلاتین دور ریخته شده و سلول‌ها را با نرمال سالین، سه بار شسته و آنگاه محیط کشت جدید به آنها اضافه شد. پس از این مرحله سلول‌ها برای ادامه رشد به انکوباتور منتقل گردیدند. در طی ۶ روز بعد، تعداد سلولها پتریدیش‌هایی که در معرض دارو قرار گرفته و یا به عنوان شاهد بودند، شمارش شد. برای شمارش سلول‌ها، هر روز سه پتریدیش از گروه شاهد و سه پتریدیش از گروه کنترل انتخاب شده و پس از شستشو و تریپسیناسیون، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده با ۱۰۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو مخلوط گردید. حدود ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط را روی لام هموسایتومتر قرار داده و توسط میکروسکوپ، مربع وسط و دو مربع بالا و پایین لام شمارش شدند. از اعداد شمارش شده میانگین گرفته شده و طبق معادله زیر، تعداد سلول‌ها در ۱mL از سوسپانسیون سلولی به دست می‌آمد.

## یافته‌ها

نمودار ۱، منحنی رشد حاصل از کاشت ۳۰۰۰۰ سلول CHO در محیط کشت DMEM/F-12 را نمایش می‌دهد. این نمودار بیانگر پیروی رشد جمعیت این سلول‌ها از مرحله کاهش اولیه (در طی ۲۴ ساعت اول)، مرحله رشد تصاعدی یا اصطلاحاً فاز لگاریتمی رشد، و آن‌گاه مرحله رشد ثابت یا زمان تساوی تکثیر با مرگ سلول‌ها و نهایتاً مرحله مرگ جمعیت سلولی است. در همین نمودار به مقایسه رشد ۳۰۰۰۰ سلول سرطان تخمدان همسترچینی CHO که برای مدت یک ساعت قبل از کاشت با غلظت‌های  $0/5 \mu\text{g/ml}$  و  $1 \mu\text{g/ml}$  از سیس پلاتین برخوردار داشته‌اند نیز، پرداخته شده است. در رسم این اشکال از روش ترسیم منحنی Cubic splin و برنامه رایانه‌ای Prism استفاده شده است.

$10^4 \times$  میانگین تعداد سلول شمارش شده  $\times$  ضریب رقت = تعداد سلول شمارش شده/ml

برای تعیین کمی سمیت سلولی سیس پلاتین آزمون سنجش تعداد کلنی استفاده شده است. در این آزمون پس از کاشت ۱۰۰۰ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۶ تایی کشت سلولی، حجم نهایی داخل هر چاهک به ۴ میلی‌لیتر رسانده شد و سیس پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند. پس از بررسی وضعیت سلامت سلول‌ها و اطمینان از عدم آلودگی، غلظت‌های مختلف  $0/5$ ،  $1$ ،  $2/5$ ،  $5$ ،  $10$ ،  $20$ ،  $50$  و  $100 \mu\text{g/ml}$  از سیس پلاتین به مدت ۱ ساعت با سلول‌ها برخورد داده شدند. از پلیت‌های مجاور شده با حلال دارو (نرمال سالین) به عنوان شاهد استفاده شد. سیس، مانند آزمایش قبل، پس از یک ساعت برخورد سلول‌ها با دارو، محیط کشت را دور ریخته و سلول‌ها سه بار با نرمال سالین شسته و سیس محیط کشت جدید اضافه شده و تا زمان رشد کلنی برای مدت ده روز در انکوباتور قرار داده شدند. پس از ۱۰ روز، تعداد کلنی‌های دارای بیش از ۵۰ عدد سلول در هر چاهک شمارش و یادداشت شد. درصد کلنی‌ها در هر چاهک با در نظر گرفتن تعداد کلنی‌های چاهک شاهد محاسبه شده است. به منظور بررسی تاثیر سیس پلاتین بر نسبت کاشت سلول‌ها، در ابتدا فلاکس‌های ۵۰ میلی‌لیتری کشت سلول که حاوی تعداد کافی از سلول‌های در فاز رشد لگاریتمی بوده‌اند را به مدت یک ساعت با غلظت  $1 \mu\text{g/ml}$  از سیس پلاتین برخورد داده و پس از این مدت شستشو و تریپسینه شده‌اند. آنگاه تعداد ۳۰۰۰۰ سلول از این فلاکس‌ها در چاهک‌های پلیت‌های شش چاهکی کاشته و ۴ میلی‌لیتر محیط کشت تازه بدانها اضافه شد. اعمال فوق عیناً بر روی سلول‌های شاهد نیز انجام شد ولی به جای دارو سلول‌ها با همان حجم نرمال سالین برخورد داده شد. تعداد سلول‌های سه چاهک شاهد و همچنین تعداد سلول‌های سه چاهک که از سلول‌های برخورد داده شده با سیس پلاتین تهیه شده بودند، در هر روز پس از انجام آزمایش تا یک هفته شمارش شده‌اند.

لازم به ذکر است، غلظت نهایی برای افزودن به محیط کشت سلول‌ها به طریقی صورت پذیرفته که بیش از  $0/075\%$  حجمی محیط کشت رشد و سلول‌های تحت آزمایش نباشد. هر یک از آزمون‌های فوق، سه بار و در هر بار به صورت تریپلیکت (سه تایی) انجام شده و نتایج به صورت متوسط و انحراف معیار ( $\text{Avg} \pm \text{SD}$ ) نشان داده نشده است. بررسی‌های آماری توسط برنامه رایانه‌ای Prism انجام شده است.

**A-1:** منحنی رشد سلول‌های همسترچینی (CHO) در حالت عادی و همچنین پس از یک ساعت برخورد با غلظت‌های  $1 \mu\text{g/ml}$  و  $0/5 \mu\text{g/ml}$  از سیس پلاتین.

**B:** منحنی A پس از حذف منحنی رشد عادی برای نمایش بهتر منحنی رشد سلول‌های CHO پس از برخورد با غلظت‌های گوناگون سیس پلاتین

جدول ۱- پارامترهای رشد سلولهای هامستر چینی (CHO) در محیط آزمایشگاه بدون برخورد با سیس پلاتین (گروه کنترل) و پس از یک ساعت برخورد با  $1 \mu\text{g/ml}$  سیس پلاتین (گروه آزمایش).

کمیت مورد بررسی (ساعت)	گروه کنترل	گروه آزمایش
زمان مرحله لگاریتمی	$24/5 \pm 1/5$	$27 \pm 4$
شیب مرحله لگاریتمی رشد	$3/1 \pm 2/2$	$1/46 \pm 0/26$
زمان دوبله شدن (doubling time)	$18/26 \pm 2/6$	$13/15 \pm 2/6$
زمان رشد صاف (plateau)	$25/4 \pm 1/5$	$14/66 \pm 7/7$
مدت زمان تا کاهش رشد	$49/9 \pm 0$	$39/1 \pm 7$

در جدول ۱، پارامترهای کمی حاصل از منحنی رشد سلولهای سرطان تخمدان هامستر چینی با و یا بدون یک ساعت برخورد با غلظت  $1 \mu\text{g/ml}$  از سیس پلاتین را نشان می‌دهد. پارامترهای سرعت دوبله شدن و همچنین نسبت کاشت، به ترتیب از روی فاز رشد لگاریتمی و همچنین ۲۴ ساعت اول پس از کاشتن سلول بدست آمده است.

نمودار ۲ تاثیر سمی سیس پلاتین در جلوگیری از تکثیر و ایجاد کلنی‌های سلولی در سلولهای سرطان تخمدان را نمایش می‌دهد. براساس این نمودار، ارتباط دوز- پاسخ مناسبی تا غلظت  $1 \mu\text{g/ml}$  سیس پلاتین در این خط سلولی مشاهده شده است. این منحنی حاصل بهترین خط قابل عبور محاسبه شده توسط برنامه کامپیوتری Prism با مدل دوز- پاسخ می‌باشد.

نمودار ۲- سنجش سمیت سلولی سیس پلاتین بر خط سلول سرطانی هامستر چینی (CHO) پس از یک ساعت برخورد با غلظت های گوناگون این دارو. خط باریک بیانگر غلظت کشنده پنجاه درصد از جمعیت سلولی ( $IC_{50}$ ) می‌باشد.

در جدول ۲، نتایج کمی حاصل از آزمون شمارش کلنی سلولهای سرطان تخمدان پس از یک ساعت برخورد با غلظت‌های گوناگون سیس پلاتین آمده است.

جدول ۲- نتایج کمی حاصل از آزمایش شمارش کلنی های سلولی هامستر چینی (CHO) پس از یک ساعت برخورد با غلظت های گوناگون سیس پلاتین به نسبت سلولهای شاهد.

پارامتر مورد بررسی	کمیت
تعداد فازهای منحنی	۳
شیب فاز اول	$-6/3$
غلظت مرگ ۹۰٪ سلولها ( $IC_{90}$ )	$> 5 \mu\text{g/ml}$
غلظت مرگ ۵۰٪ سلولها ( $IC_{50}$ )	$0/5 \mu\text{g/ml}$
غلظت مرگ ۲۵٪ سلولها ( $IC_{25}$ )	$0/1 \mu\text{g/ml}$

## بحث

اولین اقدام در بررسی دقیق و کشف زوایای تاثیر داروها بر رده‌های مختلف سلول سرطانی، رسم منحنی رشد و یافتن فاکتورهای رشد هر یک از این سلولهاست. در تحقیق حاضر نیز ابتدا منحنی رشد مربوط به سلول تخمدان هامستر چینی (CHO) رسم شد. همانطور که در نمودار ۱ نمایش داده شده است، در منحنی رشد بدون برخورد با دارو (شاهد) سلول‌ها یک دوره نزول اولیه پس از قرار گرفتن در محیط جدید را می‌گذرانند. در طی این مرحله که بسته به نوع سلول در زمان‌های گوناگون روی می‌دهد، تعدادی از سلولها به پایه رشد (سطح فلاسک رشد) چسبیده و به بقای خود ادامه می‌دهند؛ در حالی که مابقی سلول‌ها چنین قدرتی را نداشته و عملاً از مسیر حیات خارج می‌شوند. قابلیت و یا عدم قابلیت تطابق با محیط جدید، چسبندگی به سطح رشد جدید و ادامه حیات به عوامل گوناگون ذاتی سلول و همچنین شرایط آزمایشگاهی وابسته است. از جمله این موارد درصد تخریب گلیکوپروتئین‌های سطح سلول‌ها در طی تریپسینه شدن، شرایط دما در آزمایشگاه و همچنین نوع و محتویات محیط کشت می‌باشد. با رعایت دقیق این نکات عملاً شرایط اپتیمم تکثیر و کاشت این سلول‌ها در آزمایشگاه حاصل آمد. انحراف معیار (SD) اندک نقاط گوناگون منحنی رشد، به خصوص چند نقطه اول پس از کاشت سلولها، مویید موفقیت محققین در حصول به شرایط اپتیمم است. در هر صورت علیرغم رعایت دقیق شرایط مناسب رشد، پس از تریپسینه شدن، درصدی از سلولها قابلیت کاشت مجدد و تکثیر را از دست می‌دهند که این از خصوصیات ذاتی سلولها بوده و اصولاً به مسیرهای سیگنالی و حیاتی در سطح ژنی (up stream) و یا پروتئین‌های ساختمانی و عملکردی (down stream) هر رده سلولی مربوط می‌گردد. چنین

درصدی که با عدد نسبت کاشت (plating efficacy) در خصوص هر رده سلولی مشخص می‌گردد، برای سلولهای سرطان تخمدان هامستر چینی بکار گرفته شده در این تحقیق  $6/54 \pm 47/88$  محاسبه شده است.

پس از اتصال اولیه به پایه رشد و احراز قابلیت تکثیر، سلولهای سالم، فاز رشد لگاریتمی را آغاز نموده و به صورت توانی ازدیاد می‌یابند. به این ترتیب این مرحله مناسب‌ترین مرحله برای محاسبه زمان دو برابر شدن تعداد سلولها (doubling time) خواهد بود که خود از مشخصات اختصاصی هر رده سلولی بوده و در صورت سلامت سلول با انحراف معیار قابل قبولی ثابت می‌باشد. پس از مدتی سرعت تکثیر با مرگ سلولها یکسان شده و جمعیت سلولی در یک فاز ثابت و یا Plateau خواهد ماند. تداوم این فاز به افزایش نسبی مرگ در مقابل تکثیر سلولهای جدید و در نتیجه کاهش جمعیت سلولی می‌انجامد که آنرا مرحله نقصان و یا کاهش می‌نامند. روش‌های بسیار گوناگونی از جمله شمارش تعداد سلولها، بررسی جذب رنگ نوترال رد، بررسی تغییرات رنگ‌های فلورسانس تحت اثر آنزیم‌های میتوکندریایی و بررسی تغییرات DNA سلول برای بررسی اثرات سمی داروها بر خطوط سلولی و کسب اعداد کمی از سمیت سلولی مواد گوناگون وجود دارد (۱۳). در این تحقیق از روش سنجش تعداد کلنی‌های تشکیل شده برای سنجش سمیت سلولی سیس پلاتین استفاده شده است. مزیت این روش بر دیگر روش‌های سنجش سمیت سلولی آن است که نتیجه نهایی، حاصل تاثیر کلی ماده بر روند حیات سلول بدون توجه به محل اثر ماده، مکانیسم عمل و همچنین فعل و انفعالات واکنشی سلول چون مقاومت و ترمیم آسیب خواهد بود. کلنی زایی یک معیار کلی از حفظ سلامت و قابلیت تکثیر سلول و عدم تشکیل کلنی بیانگر عدم سلامت و ضعف در تکثیر سلول می‌باشد. در واقع نتیجه بدست آمده از آزمایش سنجش کلنی‌زایی حاصل کلی تمامی کنش و واکنش‌های مواد سمی و سلول بوده و پاسخ نهایی سمیت و یا عدم سمیت ماده مورد آزمایش است. نمودار ۲ تعداد کلنی‌های تشکیل شده از تعداد ثابتی سلول‌های مجزای کاشته شده در محیط کشت پس از برخورد با غلظت‌های گوناگون سیس پلاتین در مدتی معادل دو نیمه عمر بیولوژیک دارو (یک ساعت) را نمایش داده است. همان طور که در این نمودار نشان داده شده است، سیس پلاتین تا غلظت مشخصی (۱  $\mu\text{g/ml}$ ) تاثیر بارز سمی بر سلول‌های سرطان تخمدان داشته و تعداد کلنی‌های حاصل را بشدت کاهش داده است. پس از این سیر نزولی اولیه، منحنی تعداد کلنی‌های تشکیل شده در مقابل غلظت

بیشتر سیس پلاتین مسیر مستقیمی را در برگرفته و عملاً افزایش بیشتر غلظت دارو بر سلامت سلول بی‌تاثیر بوده است. چنین شکلی در منحنی دور- پاسخ می‌تواند بیانگر احتمال دو روند متفاوت در برخورد سلول تخمدان با اثرات سمی سیس پلاتین باشد.

با توجه به آنچه Stewart در بررسی منحنی‌های سمیت سلولی داروها (۱۴) و Smith and Raaphorst در بررسی مکانیسم سمیت داروهای آلکیله کننده و پرتوهای یونیزان بیان داشته‌اند (۱۵)، تفاوت معنی‌دار در شیب منحنی پس از غلظت  $1 \mu\text{g/ml}$  این نکته را پیشنهاد می‌کند که احتمالاً سلولهای CHO پس از برخورد با غلظت‌های بیش از  $1 \mu\text{g/ml}$  سیس پلاتین مکانیسم دفاعی خاصی را آغاز می‌نمایند که از تاثیر بیشتر دارو بر آنها ممانعت به عمل می‌آورد. چنین برداشتی از این نمودار می‌تواند معرف توانایی این سلول‌ها بر ایجاد مقاومت فعال در مقابل این دارو باشد که از غلظت مشخصی  $1 \mu\text{g/ml}$  بروز می‌نماید. تفسیر دیگر بر منحنی حاصل از تاثیر سیس پلاتین بر سلول‌های CHO می‌تواند چنین باشد که جمعیت سلول‌های CHO از دو زیرگروه متفاوت تشکیل شده‌است، به شکلی که در حدود ۶۰٪ از جمعیت سلولی حاضر (محل تغییر شیب منحنی در محور y) دارای محل اثر بسیار مناسب و حساسی برای سمیت سیس پلاتین هستند. ۴۰٪ باقیمانده سلول‌ها در جمعیت سلولی CHO فاقد محل اثر حساس مفروض فوق‌الذکر در زیر جمعیت اولیه بوده و لذا این سلول‌ها از مقاومت ذاتی نسبی به سیس پلاتین برخوردارند. این تئوری می‌تواند مبنایی برای جداسازی زیر گروه سلول‌های مقاوم به سیس پلاتین در جمعیت سلولی CHO به شمار آید.

از سوی دیگر غلظت  $1 \mu\text{g/ml}$  سیس پلاتین برای سلول‌های سرطان تخمدان هامستر چینی به عنوان بالاترین غلظتی است که تاثیر دوز- پاسخ مستقیم، مشخصی و بارزی از آن قابل انتظار است. این یافته می‌تواند معیار خوبی برای استفاده‌های بالینی بوده و پزشک را در محدوده غلظتی که می‌تواند انتظار مشاهده دوز- پاسخ مستقیم داشته باشد راهنمایی کند. در ضمن این غلظت در محدوده غلظت معمول پلاسمایی سیس پلاتین که در پی مصارف بالینی، شیمی درمانی بیماران حاصل می‌آید، وجود دارد.

به منظور بررسی و شناخت دقیق‌تر تاثیر سیس پلاتین بر هر یک از فاکتورهای رشد سلولی، سلول‌های سرطان تخمدان به مدتی معادل دو نیمه عمر بالینی سیس پلاتین (یک ساعت) در مجاورت بالاترین غلظتی از این دارو که ارتباط معنی‌دار دوز- پاسخ مشاهده شده است (غلظت  $1 \mu\text{g/ml}$ ) قرار گرفته و سپس در محیط کشت فاقد دارو

قرار داده شده‌اند. همچنان که در نمودار ۱ مشاهده شده است، نتایج حاصل مویید عدم تاثیر قابل ملاحظه سیس پلاتین بر فاکتورهای رشد سلولی است. در واقع بیشترین و معنی‌دارترین تاثیر سیس پلاتین بر نسبت کاشت سلول‌ها (plating efficacy) در طی اولین مرحله منحنی رشد سلول‌ها مشاهده شده است. تاخیر نسبی سیس پلاتین در کاهش دیگر پارامترهای رشد در فازهای بعدی منحنی رشد سلول‌های CHO را می‌توان با اطمینان قابل قبولی به تاثیر کاهشده اولیه این دارو بر نسبت کاشت سلول‌ها مربوط دانست. مقایسه منحنی رشد سلول‌های سرطان هامستر چینی در غیاب و یا حضور سیس پلاتین مویید این نکته است که هر چند تاثیر سیس پلاتین بر کاهش نسبی جمعیت سلولی در همه فازها مشهود است، لیکن از آنجا که جمعیت سلولی در فازهای گوناگون از تداوم رشد یک جمعیت سلولی واحد کاشت شده (نقطه اول در منحنی رشد مربوط به ۲۴ ساعت) حاصل آمده‌اند، بنابراین تاثیر بارز سیس پلاتین بر نسبت کاشت و ادامه حیات سلول‌های سرطان تخمدان به پایه رشد، مسبب اصلی کاهش نسبی جمعیت‌های سلولی در دیگر فازهای منحنی رشد سلول‌ها بوده است.

از دیگر اثرات سیس پلاتین تاثیر دارو بر فاز رشد ثابت سلول‌ها، یعنی روزهای بعد از ۳ و ۴ منحنی نمودار ۱ می‌باشد. اثر ضد میتوزی سیس پلاتین تعادل برابری سرعت تکثیر و مرگ سلولی این مرحله را دستخوش تغییر نموده و به سمت کاهش بیشتر سرعت تکثیر در برابر مرگ سلولی برده است. به این شکل فاز رشد ثابت سلول‌های برخوردار داده‌شده با سیس پلاتین کوتاه‌تر بوده و با سرعتی بیش از سلول‌های شاهد به فاز نقصان می‌انجامد. این مشاهده با یافته‌های آزمایشگاهی دیگر محققین که کشنده‌ترین اتصالات سیس پلاتین با DNA سلول را در زمان ۴۸-۷۲ ساعت پس از برخورد دارو دانسته و معتقدند که در طی آن اتصالات ضعیف یک بازویی اولیه به اتصالات عرضی، مستحکم و قوی ضد میتوزی دو بازویی تبدیل می‌گردند، سازگار است (۱۶). این مفهوم در نمودار ۱ نیز که رشد نسبی سلول‌های CHO پس از برخورد با سیس پلاتین را در مقابل سلول‌های شاهد به نمایش گذاشته است، به خوبی مشاهده می‌گردد.

هرچند که تاثیر مشخص سیس پلاتین بر نسبت کاشت سلول‌ها از نتایج بدیع این تحقیق بوده و تاکنون در دیگر مقالات اشاره‌ای به آن نشده است، لیکن اثر سیس پلاتین بر کاهش نسبی دوره فاز رشد ثابت سلول‌ها با یافته‌های قبلی در خصوص مکانیسم اثر و تاثیر آپوپتوتیک این دارو در توافق کامل بوده و قابل توجه است. مرگ القاء شده توسط سیس پلاتین عمدتاً از طریق القاء آپوپتوز و در طی

یک فرآیند ۴۸ تا ۷۲ ساعته است (۱۱). بدین ترتیب یافته‌های تحقیق حاضر مویید آن هستند که تاثیر سمی سیس پلاتین بر کینتیک رشد سلول‌های سرطان تخمدان در دو مرحله سریع اولیه (بر نسبت کاشت سلول‌ها) و تاخیری ثانویه (خاصیت تاخیری ضد میتوزی و کشنده دارو) است که در مرحله رشد ثابت سلول‌ها مشاهده می‌گردد. مشاهدات این تحقیق راهنمای خوبی برای درک بهتر مکانیسم اثر سیس پلاتین، و همچنین کاربردهای بالینی این دارو خواهد بود. در صورت تایید این نتایج در مدل‌های حیوانی، می‌توان حدس زد که افزایش دوز سیس پلاتین برای افزایش اثر، قابل تامل بوده و تعریف کلی امکان افزایش دوز تا حد سمیت کلیدی و یا عصبی برای سیس پلاتین الزاماً کاربردی نیست، چرا که تنها در محدوده غلظتی خاصی افزایش دوز به افزایش معنی‌دار اثر خواهد انجامید. از سوی دیگر تاثیر بارز و غالب سیس پلاتین بر نسبت کاشت سلول‌ها در مقابل دیگر مراحل رشد سلول‌های سرطان تخمدان می‌تواند بیانگر اثر بیشتر این ترکیب بر سلول‌های حاشیه‌ای به نسبت سلول‌های مرکزی تومور باشد. کاهش نسبت کاشت، امید کاربرد این دارو به منظور پیشگیری از لانه‌گزینی سلول‌های سرطانی در بافت‌های سالم و کاهش گسترش متاستاز سرطان را نیز نوید می‌دهد.

پاسخ سئوالات منطقی که در پی این مشاهدات از مکانیسم عمل دقیق سیس پلاتین بر سلول‌های سرطان تخمدان بذهن خواهد آمد، و همچنین توضیح مکانیسم‌های دفاعی و یا عمل چندگانه‌ای که توجیه‌کننده منحنی سمیت دو فازی این دارو در سلول‌های سرطان تخمدان هامستر چینی باشد، و پس از آن محک این یافته‌ها در طراحی برنامه‌های جدید شیمی‌درمانی، از نکاتی است که پژوهشهای جدیدی را می‌طلبد.

## تشکر و قدردانی

انجام این پژوهش بدون همکاری آزمایشگاه کشت سلولی گروه سم شناسی / داروشناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ممکن نبوده است. بدین وسیله از همکاری مسئولین این دانشکده، علی‌الخصوص همکاران آزمایشگاه‌های سم شناسی و کشت سلولی دانشکده تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین وظیفه خود می‌دانیم که از همکاری دکتر R. Goel و دکتر D.J. Stewart از مرکز سرطان اونتااریو در اوتاوا، کانادا که در تهیه برخی از مواد شیمیایی ما را یاری کردند، یاد و کمال قدردانی را داشته باشیم.

## REFERENCES

1. Reed E. *Platinum analogs*. In: Devita V, Rosenberg S, editors. Cancer principles and practice of oncology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Company; 1993; 390-400.
2. Douple EB, *Interaction between platinum coordination complexes and radiation* In: Douple EB, editor, Anti-Tumour drug-radiation Interaction. New York, CRC Press, 1990; 12-15.
3. Trimmer EE, Essigman JM. Cisplatin. *Essays Biochem* 1999; 34: 191-211.
4. Munchausen LL, Rahn RD. Biologic and chemical effect of cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC 119875) on DNA. *Cancer Chemothe Rep* 1975; 59: 643-646.
5. Neil AJ, Turner J, Mcilwrath A, et al. Cisplatin and paclitaxel induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53. *Mol. Pharmacol* 1998; 53: 819-26.
6. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(8-9): 1229-35.
7. Manic S, Gatti L, Carenini N, et al. Mechanisms controlling sensitivity to platinum complexes: role of p53 and DNA mismatch repair. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3(1): 21-9.
8. Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, et al. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol* 1998; 72: 536-540.
9. Charles AT, Frazier JM., *In-vitro biological system* In: Charles AT, editor, Methods in Toxicology, London: Academic Press, 1993, 1-20.
10. Wozniak K, Blasiak J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim Pol* 2002; 49(3): 583-596.
11. Fuertesa MA, Castillab J, Alonsoa C, Perez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem* 2003; 10(3): 257-266.
12. Gibb RK, Taylor DD, Wan T, et al. Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecol. Oncol* 1997; 65: 13-22.
13. Kawada K, Yonei T, Ueoka H, et al. Comparison of chemosensitivity tests: clonogenic assay versus MTT assay. *Acta Med Okayama* 2002; 56(3): 129-34.
14. Stewart DJ, Goel R, Shirazi FH, et al., Cisplatin resistance. 16<sup>th</sup> *Ann Ottawa Rep Biol Workshop* 1997; 13:14.
15. Smith DM, Raaphorst GP. Adaptive responses in human glioma cells assessed by clonogenic survival and DNA strand break analysis. *Int J Radiat Biol* 2003; 79(5): 333-9.

سرفحه ها

سيس پلاتين و سلول سرطانى تخمدان

۱۹۲ / دو ماهنامه پژوهنده

دکتر سيدفرشاد حسيني شيرازى و دکتر معصومه افتخارى / ۱۹۳

شماره ۴۰، مهر و آبان ۱۳۸۳

سيس پلاتين و سلول سرطانى تخمدان

۱۹۴ / دو ماهنامه پژوهنده

دکتر سيدفرشاد حسيني شيرازى و دکتر معصومه افتخارى / ۱۹۵

شماره ۴۰، مهر و آبان ۱۳۸۳

