

## بررسی اثر توأم ۲- متوکسی استرادیول و متوکسی آمین بر حساسیت زایی IUDR نسبت به پرتو گاما کبالت ۶۰ در مدل کشت اسفروید از سلول های گلیوبلاستوما به روش سنجش توانایی کلنی زایی

### خلاصه

**زمینه و هدف:** گلیوبلاستوما رایج ترین و خطرناک ترین سرطان سیستم عصبی مرکزی است و پرتودرمانی هدفمند یک روش مؤثر برای درمان آن می باشد. IUDR یک آنالوگ تیمین است که به عنوان یک حساس کننده پرتویی در درمان سرطان شناخته شده است. گزارش شده است که متوکسی آمین میزان آسیب های DNA را در سلول های حاصل از اسفرویدهای گلیوبلاستوما انسانی از طریق مسدود کردن مسیر ترمیم برش بازی افزایش می دهد، این در حالی است که شکستگی های رشته DNA در اسفرویدهای بزرگ تر کاهش می یابد که این مسئله به دلیل عدم برداشت IUDR توسط سلول های موجود در فاز Go در اسفرویدهای بزرگ تر است. HIF-1 $\alpha$  یک فاکتور رونویسی هتروداپمر است که مسئول توقف چرخه سلولی سلول های اندوتلیال در فاز Go/G1 می باشد. به تازگی شناخته شده است که فعالیت HIF-1 $\alpha$  می تواند توسط ۲- متوکسی استرادیول مهار شود که این مسئله منجر به مهار توقف چرخه سلولی می شود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تلاش کردیم اثرات توأم متوکسی استرادیول و متوکسی آمین بر روی حساسیت زایی پرتوی IUDR در کشت اسفرویدی سلول های گلیوبلاستوما را بررسی کنیم. آسیب های سیتوتوکسیک سلول های U87MG با استفاده از آزمون سنجش توانایی کلنی زایی، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و آزمایشات با استفاده از اسفرویدهایی به قطر ۳۵۰ میکرون انجام شد.

**یافته ها:** نتایج ما نشان داد که آسیب های حاصل از پرتو یونیزان به دنبال حساسیت زایی IUDR در اسفرویدهای پیش تیمار شده با متوکسی استرادیول و متوکسی آمین بسیار بیشتر ( $p \leq 0.001$ ) از به کار بردن هر یک از این عوامل به تنهایی می باشد. **نتیجه گیری:** این نتایج نقش مهم متوکسی استرادیول را در مطالعات مرتبط با IUDR در درمان سرطان نشان می دهد.

سمیه بابالویی<sup>۱</sup>

دکتر علی نشاسته ریز<sup>۲</sup>

دکتر سمیده خوئی<sup>۳</sup>

مریم آذریان<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد فیزیک پزشکی (مؤلف مسؤول)

<sup>۲</sup> دانشیار و PhD فیزیک پزشکی، گروه رادیولوژی،

دانشکده پیراپزشکی

<sup>۳</sup> استادیار و PhD بیوفیزیک، گروه فیزیک پزشکی،

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات

بهداشتی درمانی ایران.

<sup>۴</sup> کارشناس ارشد بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه،

دانشگاه آزاد اسلامی (واحد علوم تحقیقات)

نویسنده مسؤول: سمیه بابالویی

پست الکترونیک: s\_babaloui@yahoo.com

### مقدمه

گلیوما بدخیم، رایج ترین تومور اولیه مغزی می باشد که سالانه از هر ۱۰۰۰۰ نفر، ۵ نفر به این بیماری مبتلا می شوند [۱]. به طور طبیعی، جراحی به همراه پرتودرمانی، اولین استراتژی درمانی برای درمان آن می باشد هر چند که مقاومت بافت نرمال مهم ترین مانع در درمان تومورهای جامد مانند گلیوما است [۲]. در سال های اخیر روش های درمانی ترکیبی با استفاده از عوامل شیمیایی / بیولوژیکی و پرتودرمانی، جهت افزایش حساسیت پرتویی تومور یا کاهش اثرات جانبی پرتوهای یونیزان به کار گرفته می شود. IUDR یک آنالوگ تیمین است که به عنوان یک حساس کننده پرتویی بالقوه برای درمان سرطان های انسانی شناخته شده است. IUDR در طول همانندسازی رشته DNA به جای باز تیمین قرار می گیرد و باعث افزایش حساسیت پرتویی سلول ها به پرتوهای یونیزان می شود. اگرچه مکانیزم بیوشیمیایی حساس کننده های پرتویی مانند IUDR کاملاً شناخته شده نیست، مطالعات نشان داده است که این عوامل در واکنش با الکترون های هیدراته القاء شده توسط پرتو یونیزان، رادیکال های آزاد واکنش گر اوراسیل و یون های هالید را

ایجاد می کنند که نتیجه آن، ایجاد شکست های تکررشته ای DNA و متعاقب آن شکست های دو رشته ای DNA است و در صورت عدم ترمیم یا ترمیم ناقص، سبب مرگ سلولی می شود [۳].

مطالعات نشان داده است که ترمیم برش بازی<sup>۱</sup> یک مسیر ترمیم سلولی مهم برای برطرف کردن آسیب های ناشی از IUDR (مانند آسیب به بازها، شکست های تکررشته ای و دو رشته ای DNA) است [۴]. متوکسی آمین یک مهارکننده شیمیایی است که به طور اختصاصی در فرآیند ترمیم BER مداخله کرده و با مسدود کردن این مسیر ترمیم، موجب مرگ سلول می شود. متوکسی آمین با قسمت های فاقد باز داکسی ریبوز تولید شده در رشته DNA که به دنبال برداشت باز غیرطبیعی به وسیله DNA-گلیکوزیلاز به وجود می آید واکنش می دهد [۵]. مطالعات نشان داده است که متوکسی آمین میزان صدمات DNA را با افزایش شکست های رشته DNA در کشت اسفرویدی سلول های U87MG افزایش می دهد [۶]. اسفرویدها کشت های سلولی سه بعدی

<sup>۱</sup> Base Excision Repair (BER)

جنین گاوی (Gibco) و ۰/۲۲ گرم  $\text{NaHCO}_3$  (Merck) کشت داده شده است.

**کشت تک لایه:** جهت کشت تک لایه، سلول‌ها با دانسیته  $10^4 \text{ cells/cm}^2$  در فلاسک‌های T-25 (Nunc) کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور  $37^\circ\text{C}$  و  $5\% \text{ CO}_2$  و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. جهت تریپسینه کردن سلول‌ها، از محلول  $0.25\% / 0.03\% / 0.03\%$  تریپسین و EDTA در بافر نمکی فسفات استفاده شد.

**کشت اسفروبیید:** جهت کشت اسفروبیید، تعداد  $5 \times 10^5$  سلول در  $10$  میلی‌لیتر محیط کشت MEM حاوی  $10\% \text{ FCS}$  بر روی پتری‌های  $100 \text{ mm}$  پوشیده شده با لایه نازکی از آگار  $1\%$  کشت داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور  $37^\circ\text{C}$  با  $5\% \text{ CO}_2$  و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. هر سه روز یک بار نیمی از محیط کشت با محیط تازه جایگزین می‌شد.

**تیمار دارویی با IUDR:** به منظور بررسی اثر حساس‌کنندگی IUDR در سلول‌های گلیوما در حضور پرتو، به پتری حاوی اسفروبییدهای با قطر  $350$  میکرومتر به ازای هر  $10$  سی‌سی محیط کشت،  $100 \mu\text{M}$  دارو با غلظت  $100 \mu\text{l}$  اضافه شد (تا غلظت موجود در هر پتری به یک میکرومولار برسد) و به مدت یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیدها، نمونه‌ها تیمار شدند.

**تیمار دارویی با متوکسی‌آمین:** جهت مسدود نمودن عمل ترمیم DNA از متوکسی‌آمین استفاده شد. برای انجام این کار پیش از افزودن IUDR، به ازای هر  $10$  سی‌سی محیط کشت حاوی اسفروبییدهای گلیوما،  $100 \mu\text{l}$  دارو با غلظت  $600 \text{ mM}$  اضافه شد (تا غلظت موجود در هر پتری به شش میلی‌مولار برسد) و به مدت یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیدها، نمونه‌ها تحت تیمار دارویی قرار گرفتند.

**تیمار دارویی با ۲- متوکسی‌استرادیول:** جهت مهار بیان و غیرفعال کردن پروتئین‌های  $\text{HIF-1}\alpha$  در سلول‌های هایپوکسیک، از ۲- متوکسی‌استرادیول استفاده شد. برای انجام این کار، به ازای هر  $10$  سی‌سی محیط کشت حاوی اسفروبییدهای گلیوما،  $25 \mu\text{l}$  دارو با غلظت  $250 \mu\text{M}$  اضافه شد (تا غلظت موجود در هر پتری به  $250$  میکرومولار برسد) و به مدت یک‌بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیدها، نمونه‌ها تحت تیمار دارویی قرار گرفتند.

**پرتودهی:** در این مطالعه از دز  $2$  گری پرتو گاما کبالت  $60$  (Teriton 760) با آهنگ دوز  $29/109$  سانتی‌گری/دقیقه جهت پرتودهی استفاده شد. به همین منظور پس از گذشت یک زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیدها، نمونه‌ها تحت تابش پرتو گاما قرار گرفتند.

هستند که مانند تومورهای جامد، سلول‌های این مدل کشت در اکثر موارد در مقابل آثار مرگ‌بار پرتوهای یونیزان نسبت به سلول‌های کشت تک لایه مقاوم‌تر هستند که Durand این مقاومت را ناشی از اتصالات خاص بین سلولی موجود در ساختار سه بعدی که آن را پدیدهٔ تماسی نامید، می‌دانست [۷]. با افزایش حجم اسفروبیید میزان مقاومت پرتویی افزایش می‌یابد که به دلیل وجود سلول‌ها موجود در فاز  $\text{G}_0/\text{H}$  هایپوکسی می‌باشد و قادر به برداشت IUDR نیستند [۶]. مطالعات نشان داده است که تحت شرایط کمبود اکسیژن<sup>۱</sup>، سطح فاکتور القاکننده هایپوکسی<sup>۲</sup> افزایش یافته و افزایش این پروتئین منجر به توقف چرخه سلولی می‌شود [۹و۸]. لذا با استفاده از یک عامل مهارکننده  $\text{HIF-1}\alpha$  می‌توان از ورود سلول‌ها به فاز  $\text{G}_0$  جلوگیری نموده و امکان جذب IUDR و در نتیجه ایجاد حساسیت پرتویی را افزایش داد. مطالعات نشان داده است که ۲- متوکسی‌استرادیول<sup>۳</sup> قادر است مانع از بیان ژن  $\text{HIF-1}\alpha$  و جلوگیری از فعالیت این ژن شود [۱۰]. ۲- متوکسی‌استرادیول یک متابولیت درونی از استروژن‌های طبیعی بدن است که اثرات ضد رگ‌زایی و ضد توموری امیدوارکننده‌ای را در مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است [۱۱] بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات حساس‌کنندگی IUDR به همراه متوکسی‌آمین و متوکسی‌استرادیول به ترتیب به‌عنوان مهارکننده ترمیم برش بازی و بازدارنده بیان و فعالیت  $\text{HIF-1}\alpha$  بوده و این آزمایش بر روی اسفروبیدهای با قطر  $350$  میکرون که حاوی لایه هایپوکسی هستند انجام شده است.

یکی از روش‌های شناخته شده و قابل اعتماد در مطالعات رادیوبیولوژیکی، روش سنجش توانایی کلنی زایی است. سنجش توانایی کلنی زایی که ما نیز در این مطالعه از آن استفاده کرده‌ایم یک روش سنجش میزان بقاء سلول *in vitro* می‌باشد که بر پایه توانایی یک سلول در ایجاد کلنی استوار است. با توجه به اینکه قبل یا بعد از تیمار سلول‌ها، فقط بخشی از سلول‌های کشت شده توانایی تولید کلنی را در خود حفظ می‌کنند، این روش سنجش، یک روش انتخابی برای تعیین مرگ تولیدمثلی سلول بعد از تیمار با پرتوهای یونیزان می‌باشد، اما می‌توان از آن برای تعیین میزان اثر بخشی دیگر عوامل مسمومیت‌زا نیز استفاده کرد [۱۲].

## روش بررسی

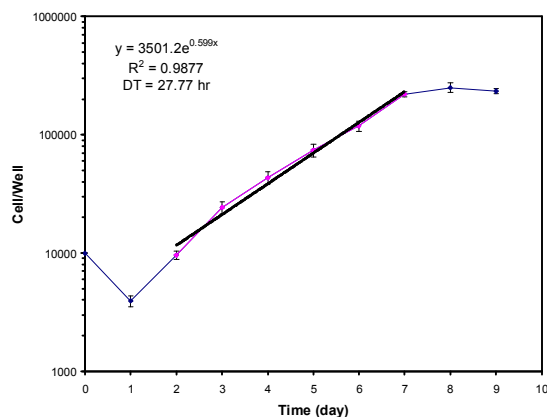
**رده سلولی:** رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه، U87MG با منشأ گلیوما انسانی خریداری شده از انستیتو پاستور ایران بوده است؛ که در محیط کشت MEM (Gibco) حاوی پنی سیلین ( $100 \text{ u/ml}$ )، استرپتومایسین ( $0.25 \mu\text{g/ml}$ ) (Sigma)،  $10\%$  سرم

<sup>1</sup>- Hypoxia

<sup>2</sup>- Hypoxia Inducible Factor (HIF-1 $\alpha$ )

<sup>3</sup>- 2-Methoxyestradiol (2ME2)

گروهی که طی یک VDT تحت تیمار با 2ME2 قرار گرفته بودند به صورت زیر تقسیم شده و طی یک VDT دیگر تحت تیمار دارویی با IUDR (1 μM) [۱۳] و متوکسی آمین (6mM) [۶] و متوکسی استرادیول (250 μM) قرار گرفتند.



شکل ۱- منحنی رشد سلول های U87MG (تعداد سلول بر حسب زمان). جهت تعیین زمان دو برابر شدن سلول ها، خطی به بخش لگاریتمی منحنی منطبق شده است (خط مشکی پررنگ) و DT سلول ها از روی شیب خط تعیین شد (آزمایش سه بار تکرار شده و از انحراف معیار میانگین (SEM) سه بار تکرار استفاده شده است).

۱- vehicle، ۲- تیمار شده با 2ME2 طی یک VDT، ۳- تیمار شده با MX طی یک VDT، ۴- تیمار شده با IUDR طی یک VDT و سپس تابش پرتو گامای کبالت ۶۰، ۵- تیمار شده با 2ME2، IUDR طی یک VDT و سپس تابش پرتو گامای کبالت ۶۰، ۶- تیمار شده با MX، IUDR طی یک VDT و سپس تابش پرتو گامای کبالت ۶۰، ۷- تیمار شده با 2ME2، MX، IUDR طی یک VDT و سپس تابش پرتو گامای کبالت ۶۰. پس از پرتو دهی نمونه ها با پرتو گامای  $^{60}\text{Co}$ ، درصد سلول های زنده و میزان آسیب های سیتوتوکسیک



شکل ۲- شکل ظاهری سلول های U87 MG در کشت تک لایه با بزرگ نمایی 10x

### روش سنجش توانایی کلنی زایی: جهت بررسی میزان توانایی

کلنی زایی در نمونه ها، پس از تبدیل اسفروئیدهای هر گروه به سلول های منفرد، شمارش سلولی و تعیین تعداد سلول های زنده، تعداد ۵۰۰۰ سلول در ۵ میلی لیتر محیط کشت MEM حاوی ۱۰٪ FBS در پلیت ۶۰ میلی متری ریخته و برای هر نمونه، تعداد ۳ پتری، کشت داده شد. کلنی ها بعد از ۱۰ روز انکوباسیون به وسیله کریستال ویولت ۰/۵٪ رنگ آمیزی شده و تعدادشان توسط میکروسکوپ معکوس (Olympus) شمارش گردید و با توجه به تعداد کلنی ها، مقدار بازده کشت با استفاده از رابطه زیر به دست آمد:

$$= \text{راندمان کشت (\%)} \times 100 \text{ (تعداد سلول های کشت داده شده / تعداد کلنی های شمارش شده)}$$

در کلیه مراحل آزمایش، پس از تبدیل اسفروئیدها به سلول های تکی و پیش از انجام آزمون سنجش توانایی کلنی زایی، Viability سلول ها اندازه گیری شد که در تمام مراحل این مقدار بیش از ۹۴٪ بود. تجزیه و تحلیل آماری: از آزمون One way anova، مقادیر P-value نمونه ها محاسبه و مقایسه شدند. نمودارها و محاسبات آماری در این پژوهش به کمک نرم افزار کامپیوتری Excel 2003 انجام شده است.

### یافته ها

کشت سلول های U87MG به صورت تک لایه و رسم منحنی رشد سلولی (Growth Curve): جهت بررسی اثر داروها در پرتو درمانی گلیوما، منحنی رشد سلول های U87MG در مقیاس نیمه لگاریتمی به صورت تعداد سلول بر حسب زمان در طی ۹ روز ترسیم شد. در منطقه خطی منحنی یا فاز لگاریتمی، شیب منحنی محاسبه شد که معادل  $27/77 \pm 0/88$  ساعت بود. شکل های شماره ۱ و ۲ به ترتیب منحنی رشد و شکل ظاهری سلول های U87MG را در مدل کشت تک لایه نشان می دهد.

بررسی میزان آسیب های وارد شده به سلول های U87MG در نمونه های کنترل و تیمار شده با IUDR و متوکسی آمین و متوکسی استرادیول: برای بررسی آسیب های وارد شده به سلول های U87MG در مدل کشت اسفروئید، تیمار اسفروئیدها با داروی IUDR، متوکسی آمین و متوکسی استرادیول به شرح زیر انجام شد. به این صورت که طی یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید<sup>۱</sup> (۶۷ ساعت) [۶] اول، ۷ گروه از اسفروئیدها تحت تیمار دارویی با 2ME2 (250 μM) قرار گرفته و یک گروه به عنوان گروه کنترل محسوب گردید. این تیمار برای غیرفعال کردن و مهار پروتئین های HIF-1α که در مدت تشکیل اسفروئیدها با این قطر بیان شده اند، صورت گرفت. بعد از ۶۷ ساعت که سلول ها، 2ME2 اولیه را برداشت کردند، در مرحله بعد هفت

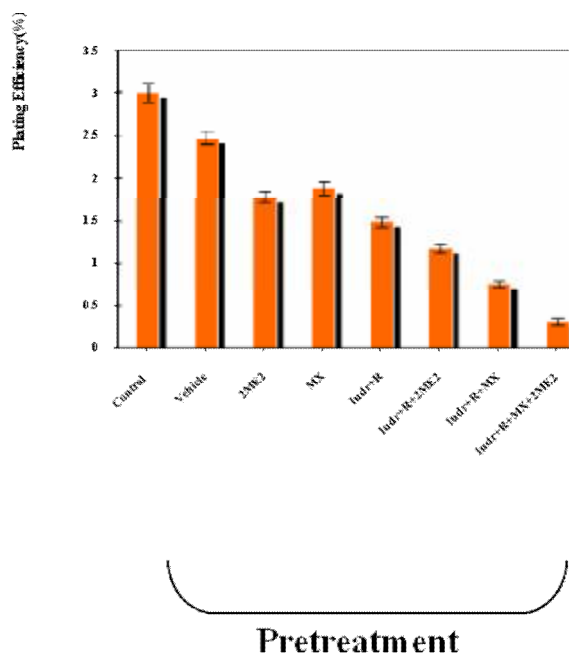
<sup>1</sup> Volume Doubling Time (VDT)

وارد شده به سلول‌ها بررسی شد. شکل شماره ۳ نشان دهنده درصد راندمان کشت به دست آمده از نمونه‌های مختلف تحت تیمار دارویی و پرتودهی سلول‌های منفرد حاصل از اسفرویدهای روز بیست و چهارم می‌باشد. همان‌طور که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود گروه‌های کنترل و vehicle به ترتیب دارای کمترین آسیب نسبت به گروه‌های دیگر هستند، اما گروه vehicle نسبت به کنترل اختلاف معنی داری دارد ( $p \leq 0/001$ ) که علت این افزایش آسیب در گروه vehicle نسبت به کنترل آپوتوز سلول‌های گلیوما می‌باشد. همچنین گروه تیمار شده با IUDR + پرتودهی اختلاف معنی داری را با vehicle ( $p \leq 0/001$ ) نشان می‌دهد. در مطالعات پیشین نیز نشان داده شده است که میزان صدمات ناشی از IUDR + پرتودهی، به مراتب بیشتر از گروه تیمار شده با IUDR به تنهایی می‌باشد [۶]. از طرفی گروه تیمار شده با 2ME2 + IUDR + پرتودهی، دارای اختلاف معنی داری با گروه IUDR + پرتودهی ( $p \leq 0/05$ ) می‌باشد. از آنجایی که تیمار اولیه با 2ME2 باعث مهار بیان و غیرفعال کردن پروتئین های HIF-1 $\alpha$  شده است، سلول‌ها توانسته‌اند IUDR را برداشت کنند و نسبت به پرتو حساس تر شوند. گروه MX + IUDR + پرتودهی نیز اختلاف معنی داری را با گروه IUDR + پرتودهی ( $p \leq 0/001$ ) نشان می‌دهد چراکه MX باعث مسدود کردن مسیر ترمیم BER شده و بدین طریق آسیب‌های حاصل از پرتو را افزایش داده است. از سوی دیگر گروه تیمار شده با IUDR + MX + 2ME2 + پرتودهی نیز دارای اختلاف معنی داری با گروه IUDR + MX + پرتودهی

نتیجه گیری

پرتودرمانی، تابش تشعشع خارجی، در درمان اکثر سرطان‌ها از اهمیت و جایگاه خاصی برخوردار است. برای استفاده بهینه از پرتودرمانی، امروزه شیوه‌های ترکیبی جهت کاهش دوز پرتوی بافت‌های سالم و در عین حال افزایش آسیب تومور، مورد نظر اکثر محققین قرار گرفته است. یکی از این عوامل، حساس‌کننده‌های پرتویی نظیر IUDR می‌باشد. این دارو اختصاصاً توسط سلول‌های در حال تقسیم که در فاز سنتز باشند برداشت می‌شود. لذا سلول‌های سرطانی و طبیعی هر دو قادر به دریافت این دارو می‌باشند. بنابراین استفاده از این عوامل دارویی مختص بافت‌های سرطانی می‌باشد که سلول‌های اطراف از قدرت تقسیم کمی برخوردار باشند. گلیوما، از نظر تئوری بهترین گزینه برای این روش درمانی می‌باشد.

محققان دریافته‌اند که اغلب آسیب‌های ناشی از حساسیت‌زایی پرتوی IUDR متوجه بازهای موجود در DNA است لذا مسیر ترمیمی که سلول برای این آسیب‌ها اتخاذ می‌کند مسیر ترمیم برش بازی است [۴]. بر پایه این اطلاعات و با توجه به فرایند منحصربه‌فرد ترمیم برش بازی، پژوهشگران دریافتند که با عامل شیمیایی متوکسی‌آمین می‌توانند این مسیر ترمیم را مختل کنند. تاکنون مطالعاتی بر روی چگونگی عملکرد متوکسی‌آمین در حضور IUDR در سطح آزمایشگاهی و بر روی مدل کشت تک لایه سلول‌های سرطان دستگاه گوارش انجام گرفته است. نتایج این مطالعات حاکی از آن است که متوکسی‌آمین و IUDR در حساس‌سازی سلول‌ها نسبت به پرتوهای یونیزان اثر هم افزایی دارند [۵]. یکی از شکست‌های عمده در پرتودرمانی سرطان‌ها، وجود سلول‌های هایپوکسیک و سلول‌های با زمان چرخه طولانی است، که از دسته سلول‌های مقاوم به پرتو می‌باشند. دلیل اینکه هایپوکسی باعث افزایش مقاومت دارویی و پرتویی می‌شود، هنوز به خوبی شناخته نشده است اما اطلاعات جدید نشان می‌دهد که در شرایط کمبود اکسیژن، بیان HIF-1 $\alpha$  با افزایش رشد اسفرویدهای توموری چند سلولی افزایش می‌یابد که باعث توقف سلول‌ها در فاز G<sub>0</sub> می‌شود [۱۴]. آزمایشات بسیاری نشان داده است که بیان پروتئین HIF-1 $\alpha$  یک نقش تنظیم‌کنندگی و کلیدی در مهار رشد سلول‌ها، در ارتباط با حفظ و نگهداری سلول‌ها در فاز خاموش G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> از چرخه سلولی ایفا می‌کند که ممکن است باعث به هم زدن پایداری سلول‌های اندوتلیال شود [۱۵]. به دلیل نقش HIF-1 $\alpha$  در چندین واقعه کلیدی که در پیشرفت سرطان اتفاق می‌افتد، این پروتئین یک هدف مولکولی مهم در درمان سرطان است.



شکل ۳- نمودار راندمان کشت به دست آمده از سلول‌های U87MG حاصل از کشت اسفروید در محیط کشت MEM حاوی ۱۰٪ FBS در نمونه‌های تحت تیمار دارویی و پرتودهی (آزمایش سه بار تکرار شده و از انحراف معیار میانگین (SEM) سه بار تکرار استفاده شده است).

مهار فرایند ترمیمی BER توسط متوکسی آمین از سوی دیگر، موجب افزایش هرچه بیشتر صدمات پرتوی می‌گردد.

همان‌طور که از پیش گفته شد با افزایش اندازه تومورها، سلول‌های موجود در فاز  $G_0$  مشکلی جدی را در درمان ایجاد می‌کنند چرا که قادر به برداشت دارو نیستند. اما همان‌طور که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود گروه تیمار شده با IUDr که در حضور 2ME2 پرتودهی شده‌اند، افزایش بیشتری در آسیب را نسبت به گروه پرتو دیده همراه با IUDr نشان می‌دهد که به دلیل مهار بیان و غیرفعال کردن پروتئین‌های HIF-1 $\alpha$  توسط 2ME2 می‌باشد. با مهار بیان این پروتئین‌ها سلول‌های هایپوکسیک توانسته‌اند فاز  $G_0$  را پشت سر گذاشته، به فاز S برسند، IUDr را برداشت کرده و نسبت به پرتو، حساسیت بیشتری از خود نشان دهند.

اما نکته دیگری که وجود دارد این است که 2ME2، باعث توقف چرخه سلولی در فاز  $G_2$ -M، در توفیق با اثرات آن روی میکروتوبول‌ها، آپوپتوز و مهار رگ‌زایی می‌شود، و این مسئله با تغییر در بیان HIF-1 $\alpha$  نیز سازگار است. یک آنالیز از چرخه سلولی بیان می‌کند که 2ME2 پیشرفت چرخه سلولی در فاز  $G_2$ -M را مهار می‌کند. نشان داده شده است که 2ME2، به‌وسیله تجزیه میکروتوبول‌های طویل شده در استئوسارکوما، سارکومای رحمی، هیپاتوما و سرطان پروستات باعث مهار پیشرفت چرخه سلولی در طول میتوز می‌شود. فاز  $G_2$ -M فاز حساس به پرتو در چرخه سلولی می‌باشد، بنابراین 2ME2 به عنوان حساس‌کننده پرتوی نیز فعالیت می‌کند. علاوه بر این اثرات حساس‌کنندگی پرتوی 2ME2 ممکن است به طور جزئی به مهار HIF-1 $\alpha$  نیز بستگی داشته باشد [۱۷].

همچنین با توجه به شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود که متوکسی‌استرادیول و متوکسی‌آمین در حضور IUDr و پس از پرتودهی دارای اثرات هم‌افزایی هستند. چرا که گروه تیمار شده با 2ME2 و MX و IUDr به‌همراه پرتودهی اختلاف معنی‌داری با گروه تیمار شده با IUDr و MX به همراه پرتودهی دارد. از سویی IUDr در حضور پرتو باعث ایجاد صدمه در DNA سلول می‌شود و به دلیل اینکه اکثر این آسیب‌ها از نوع صدمه به بازهای DNA می‌باشد، متوکسی‌آمین باعث مهار ترمیم این آسیب‌ها می‌شود، از سویی دیگر با مهار بیان پروتئین‌های HIF-1 $\alpha$  به‌وسیله 2ME2 که مسئول توقف سلول‌ها در فاز خاموش ( $G_0$ ) است، میزان برداشت IUDr بیشتر شده و به این ترتیب میزان صدمات پرتوی افزایش می‌یابد.

۲- متوکسی استرادیول یک متابولیت طبیعی از استرادیول همراه با فعالیت‌های ضد رگ‌زایی و ضد توموری می‌باشد. مکانیسم‌های سلولی عملکرد 2ME2 پیچیده هستند و میکروتوبول‌ها، ROS، مسیرهای سیگنالی ناشی از استرس، مسیرهای آپوپتوزی درونی و بیرونی درگیر، نقش‌های کلیدی را در عملکرد آن بازی می‌کنند [۱۶].

نتایج به‌دست‌آمده از آزمون سنجش توانایی کلنی‌زایی در شکل شماره ۳ به صورت یک نمودار ستونی بر حسب درصد بازده کشت ترسیم شده است. این نمودار نشان می‌دهد گروه vehicle و تیمار شده با 2ME2 طی دو زمان دو برابر شدن حجم اسفریوید، دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل می‌باشد که احتمال می‌رود ناشی از فعالیت‌های منجر به آپوپتوز 2ME2 باشد.

گروه تیمار شده با IUDr پس از پرتودهی دارای اختلاف معنی‌داری با vehicle می‌باشد. این نتیجه بیانگر آن است که با تیمار اولیه اسفریویدها با 2ME2، پروتئین‌های HIF-1 $\alpha$  که در مدت تشکیل اسفریویدهای با قطر ۳۵۰ میکرون بیان شده‌اند، غیرفعال شده، سلول‌های هایپوکسیک توانسته‌اند وارد فاز سنتز شده و IUDr را برداشت کنند. در نتیجه IUDr باعث ایجاد حساسیت نسبت به پرتو در سلول‌ها شده چرا که میزان آسیب‌های سیتوتوکسیک وارده به سلول‌ها در حضور IUDr به همراه پرتو افزایش یافته است.

از طرف دیگر گروه تیمار شده با IUDr که در حضور متوکسی‌آمین پرتودهی شده‌اند، به شکل معنی‌داری نسبت به گروه پرتو دیده همراه با IUDr، آسیب‌های بیشتری از خود نشان می‌دهد. زیرا متوکسی‌آمین با سد کردن مسیر BER که عمده‌ترین مسیر ترمیم صدمات ایجاد شده به دنبال سمیت‌زایی و حساسیت‌زایی پرتوی با IUDr است موجب افزایش صدمات DNA در اسفریویدهای گلیوما گردیده است.

با وجود آنکه شکی نیست که متوکسی‌آمین مانع ترمیم صدمات IUDr می‌گردد ولی اخیراً محققان با انجام آزمایشات فلوسایتومتري و سنجش وسترن بلات بر روی میزان جذب IUDr متوجه شدند که میزان جذب IUDr در حضور متوکسی‌آمین در مدل کشت تک لایه‌ای سلول‌های سرطان کولون افزایش می‌یابد [۵] و افزایش جذب IUDr با افزایش آسیب‌های ناشی از پرتو متناسب است. به هر حال دلیل اینکه چرا در حضور متوکسی‌آمین جذب IUDr افزایش می‌یابد در حال‌های از ابهام است اما می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش جذب از یک سو و

## منابع

1. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. The Cancer Care Ontario Practice Guidelines Institute Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a

systematic review. *Radiotherapy and Oncology* 2002; 64: 259-73.

2. Scheline GE, Wara W, Smith V. Therapeutic irradiation and brain injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1980; 6: 1215-28.

3. Fornace AJ, Dobson PP, Kinsella TJ. Enhancement of radiation damage in cellular DNA following unifilar substitution with iododeoxyuridine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18(4): 873-8.
4. Liu L, Nakatsuru Y, Gerson S.L. Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2985-91.
5. Yan T, Seo Y, Schupp JE, Zeng X, Desai AB, Kinsella TJ. Methoxyamine potentiates iododeoxyuridine-induced radiosensitization by altering cell cycle kinetics and enhancing senescence. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(4): 893-902.
6. Neshaste-Riz A, Saki M, Smideh Khoei. Cytogenic damages from iododeoxyuridine-induced radiosensitivity with and without metoxyamine in human glioblastoma spheroids. *J Yakhteh* 2008; 10(1): 57-64.
7. Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 1999; 67(3): 148-57.
8. Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes to Cells* 2002; 7(2): 143-9.
9. Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line. Implications for tumor therapy. *J Transl Med* 2006; 2(4):12.
10. Mooberry S.L. Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. *Drug Resistance Updates* 2003; 6(6): 355-61.
11. Rajkumar S.V, Richardson P.G, Lacy M.Q, Diapenziari A, Greipp P.R, Witzig T.E, Schlossman R, Sidor C.F, Anderson K.C, Gertz M.A. Novel therapy with 2-methoxyestradiol for the treatment of relapsed and plateau phase multiple myeloma. *J Clin Cancer Res* 2007; 13(20): 6162-7.
12. Franken N, Rodermond H.M, Stao J, Haveman J, Bree C.V. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 2006; 1(5): 2315-9.
13. Neshasteh riz A, Angerson WJ, Reeves JR, smith G, rampling R, mairs RJ. Incorporation of iododeoxyuridine in multicellular glioma spheroids: electron emitters. *Br J Cancer* 75(4):493-9.
14. Wartenberg M, C.Ling F, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Putz V, Hescheler V, Sauer H. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor-1 and reactive oxygen species. *The FASEB Journal Express Article* 2003; 17(3): 503-15.
15. Semenza G.L. Expression of hypoxia-inducible factor1: mechanisms and consequences. *J Biochemmical pharmacology* 2000; 59(1): 47-53.
16. Mooberry S.L. New insights into 2-methoxyestradiol, a promising antiangiogenic and antitumor agent. *J Current Opinion in Oncology* 2000; 15(6): 425-30.
17. Ricker J.L, Chen Z, Ping Yang X, Pribluda V.S, Swartz G.M, Waes C.V. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , Tumor growth and angiogenesis and augments paxitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clinical Cancer Research* 2004; 10(24): 8665-73.