مقاله پژوهشی

لیزرپزشکی؛ 1388، دوره 6، شماره 3، صفحات: 28-23.

بررسی اثر توأم ۲- متوکسی‌استرادیول و متوکسی‌آمین بر حساسیت‌زایی IUdR نسبت به پرتو گاما کبالت ۶۰ در مدل کشت اسفروییید از سلول‌های گلیوبلاستوما به روش سنجش توانایی کلنی زایی

سمیه بابالویی[1]
دکتر علی نشاسته‌ریز[2]
دکتر سمیده خوئی[3]
مریم آذریان[4]

[1]کارشناس ارشد فیزیک پزشکی (مؤلف مسؤول)
[2]دانشیار و PhD فیزیک پزشکی، گروه رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی
[3]استادیار و PhD بیوفیزیک، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران.
[4]کارشناس ارشد بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی (واحد علوم تحقیقات)

نویسنده مسئول: سمیه بابالویی
پست الکترونیک: s_babalui@yahoo.com

خلاصه

زمینه و هدف: گلیوبلاستوما رایج‌ترین و خطرناک‌ترین سرطان سیستم عصبی مرکزی است و پرتودرمانی هدفمند یک روش مؤثر برای درمان آن می‌باشد. IUdR یک آنالوگ تیمین است که به‌عنوان یک حساس‌کننده پرتویی در درمان سرطان شناخته شده است. گزارش شده است که متوکسی‌آمین میزان آسیب های DNA را در سلول‌های حاصل از اسفروییدهای گلیوبلاستومای انسانی از طریق مسدود کردن مسیر ترمیم برش بازی افزایش می‌دهد، این در حالی است که شکستگی‌های رشته DNA در اسفروییدهای بزرگ‌تر کاهش می‌یابد که این مسئله به‌دلیل عدم برداشت IUdR توسط سلول‌های موجود در فاز Go در اسفروییدهای بزرگ‌تر است. HIF-1α یک فاکتور رونویسی هترودایمر است که مسئول توقف چرخه سلولی سلول‌های اندوتلیال در فاز Go/G1 می باشد. به تازگی شناخته شده است که فعالیت HIF-1α می‌تواند توسط ۲- متوکسی استرادیول مهار شود که این مسئله منجر به مهار توقف چرخه سلولی می‌شود.

روش بررسی: در این مطالعه تلاش کردیم اثرات توأم متوکسی‌استرادیول و متوکسی‌آمین بر روی حساسیت زایی پرتوی IUdR در کشت اسفروییدی سلول‌های گلیوبلاستوما را بررسی کنیم. آسیب‌های سیتوتوکسیک سلول‌های U87MG با استفاده از آزمون سنجش توانایی کلنی زایی، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و آزمایشات با استفاده از اسفروییدهایی به قطر ۳۵۰ میکرون انجام شد.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که آسیب‌های حاصل از پرتو یونیزان به‌دنبال حساسیت زایی IUdR در اسفروییدهای پیش تیمار شده با متوکسی‌استرادیول و متوکسی‌آمین بسیار بیشتر ($p \leq ۰/۰۰۱$) از به کار بردن هر یک از این عوامل به‌تنهایی می‌باشد.

نتیجه گیری: این نتایج نقش مهم متوکسی استرادیول را در مطالعات مرتبط با IUdR در درمان سرطان نشان می دهد.

مقدمه

گلیومای بدخیم، رایج‌ترین تومور اولیه مغزی می‌باشد که سالانه از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر، ۵ نفر به این بیماری مبتلا می شوند [۱]. به‌طور طبیعی، جراحی به‌همراه پرتودرمانی، اولین استراتژی درمانی برای درمان آن می‌باشد هرچند که مقاومت بافت نرمال مهم‌ترین مانع در درمان تومورهای جامد مانند گلیوما است [۲]. در سال های اخیر روش‌های درمانی ترکیبی با استفاده از عوامل شیمیایی/ بیولوژیکی و پرتودرمانی، جهت افزایش حساسیت پرتویی تومور یا کاهش اثرات جانبی پرتوهای یونیزان به‌کار گرفته می‌شود. IUdR یک آنالوگ تیمین است که به عنوان یک حساس کنندهٔ پرتویی بالقوه برای درمان سرطان‌های انسانی شناخته شده است. IUdR در طول همانندسازی رشته DNA به جای باز تیمین قرار می‌گیرد و باعث افزایش حساسیت پرتویی سلول‌ها به پرتوهای یونیزان می‌شود. اگرچه مکانیزم بیوشیمیایی حساس‌کننده‌های پرتویی مانند IUdR کاملاً شناخته شده نیست، مطالعات نشان داده است که این عوامل در واکنش با الکترون‌های هیدراته القاء شده توسط پرتو یونیزان، رادیکال‌های آزاد واکنش‌گر اوراسیل و یون‌های هالید را ایجاد می‌کنند که نتیجه آن، ایجاد شکست‌های تک‌رشته‌ای DNA و متعاقب آن شکست‌های دو رشته‌ای DNA است و در صورت عدم ترمیم یا ترمیم ناقص، سبب مرگ سلولی می‌شود [۳].

مطالعات نشان داده است که ترمیم برش بازی[1] یک مسیر ترمیم سلولی مهم برای برطرف کردن آسیب‌های ناشی از IUdR (مانند آسیب به بازها، شکست‌های تک‌رشته‌ای و دو رشته‌ای DNA) است [۴]. متوکسی‌آمین یک مهارکننده شیمیایی است که به‌طور اختصاصی در فرآیند ترمیم BER مداخله کرده و با مسدود کردن این مسیر ترمیم، موجب مرگ سلول می‌شود. متوکسی‌آمین با قسمت‌های فاقد باز داکسی ریبوز تولید شده در رشته DNA که به دنبال برداشت باز غیرطبیعی به‌وسیله DNA-گلیکوزیلاز به‌وجود می‌آید واکنش می‌دهد [۵]. مطالعات نشان داده است که متوکسی‌آمین میزان صدمات DNA را با افزایش شکست‌های رشته DNA در کشت اسفروییدی سلول‌های U87MG افزایش می‌دهد [۶]. اسفروییدها کشت‌های سلولی سه بعدی

[1]- Base Excision Repair (BER)

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 اسفرویید میزان مقاومت پرتویی افزایش می‌یابد که به‌دلیل وجود سلول‌ها موجود در فاز G_0/هایپوکسی می‌باشد و قادر به برداشت IUdR نیستند [۶]. مطالعات نشان داده است که تحت شرایط کمبود اکسیژن[۲]، سطح فاکتور القاکننده هایپوکسی[۳] افزایش یافته و افزایش این پروتئین منجر به توقف چرخه سلولی می‌شود [۸و۹]. لذا با استفاده از یک عامل مهارکنندهٔ HIF-1α می‌توان از ورود سلول‌ها به فاز G_0 جلوگیری نموده و امکان جذب IUdR و در نتیجه ایجاد حساسیت پرتویی را افزایش داد. مطالعات نشان داده است که ۲-متوکسی استرادیول[۴] قادر است مانع از بیان ژن HIF-1α و جلوگیری از فعالیت این ژن شود [۱۰]. ۲- متوکسی استرادیول 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 متوکسی آمین و متوکسی استرادیول به‌ترتیب به‌عنوان مهارکننده ترمیم برش بازی و بازدارنده بیان و فعالیت HIF-1α بوده و این آزمایش بر روی اسفرویید‌های با قطر ۳۵۰ 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 مسمومیت زا نیزاستفاده کرد [۱۲].

روش بررسی

رده سلولی: رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه،U87MG با منشأ گلیومای انسانی خریداری شده از انستیتو پاستور ایران بوده است؛ که در محیط کشت MEM(Gibco) حاوی پنی سیلین (۱۰۰u/ml)، استرپتومایسین (۰/۲۵µg/ml) (Sigma)، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco) و ۰/۲۲ گرم $NaHCO_3$ (Merck) کشت داده شده است.

کشت تک لایه: جهت کشت تک لایه، سلول‌ها با دانسیته 10^4cells/cm^2 در فلاسک های(Nunc)T-25 کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور۳۷°C و ۵٪Co_2 و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. جهت تریپسینه کردن سلول‌ها، از محلول ۰/۲۵٪ تریپسین و ۰/۰۳٪ EDTA در بافر نمکی فسفات استفاده شد.

کشت اسفرویید: جهت کشت اسفرویید، تعداد 5×10^5 سلول در۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MEM حاوی ۱۰٪ FCS، بر روی پتری‌های ۱۰۰ mm پوشیده شده با لایه نازکی از آگار ۱٪ کشت داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷°C با ۵٪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: به‌منظور بررسی اثر حساس‌کنندگی IUdR در سلول‌های گلیوما در حضور پرتو، به پتری حاوی اسفرویید‌های با قطر ۳۵۰ میکرومتر به ازای هر ۱۰ سی‌سی محیط کشت، ۱۰۰µM دارو با غلظت ۱۰۰µl اضافه شد (تا غلظت موجود در هر پتری به یک میکرومولار برسد) و به‌مدت یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید‌ها، نمونه ها 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 ۱۰ سی سی محیط کشت حاوی اسفرویید‌های گلیوما، ۱۰۰µl دارو با غلظت ۶۰۰mM اضافه شد (تا غلظت موجود در هر پتری به شش میلی مولار برسد) و به‌مدت یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید‌ها، نمونه ها تحت تیمار دارویی قرار گرفتند.

تیمار دارویی با ۲- متوکسی استرادیول: جهت مهار بیان و غیرفعال کردن پروتئین‌های HIF-1α در سلول‌های هایپوکسیک، از ۲- متوکسی استرادیول استفاده شد. برای انجام این کار، به ازای هر ۱۰ سی‌سی محیط کشت حاوی اسفرویید‌های گلیوما، ۲۵ µl دارو با غلظت ۲۵۰µM اضافه شد (تا غلظت موجود در هر پتری به ۲۵۰ میکرو مولار برسد) و به‌مدت یک‌بار زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید‌ها، نمونه‌ها تحت تیمار دارویی قرار گرفتند.

پرتودهی: در این مطالعه از دز ۲ گری پرتو گاما کبالت۶۰ (Teriton 760) با آهنگ دوز ۲۹ /۱۰۹ سانتی گری/دقیقه جهت پرتودهی استفاده شد. به‌همین منظور پس از گذشت یک زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید‌ها، نمونه‌ها تحت تابش پرتو گاما قرار گرفتند.

1- Hypoxia
2- Hypoxia Inducible Factor (HIF-1α)
3- 2-Methoxyestradiol (2ME2)

روش سنجش توانایی کلنی زایی: جهت بررسی میزان توانایی کلنی زایی در نمونه‌ها، پس از تبدیل اسفرویید‌های هر گروه به سلول‌های منفرد، شمارش سلولی و تعیین تعداد سلول‌های زنده، تعداد ۵۰۰۰ سلول در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت MEM حاوی ۱۰٪ FBS در پلیت ۶۰ میلی‌متری ریخته و برای هر نمونه، تعداد ۳ پتری، کشت داده شد. کلنی‌ها 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 کلنی‌ها، مقدار بازده کشت با استفاده از رابطه زیر به دست آمد:

۱۰۰× (تعداد سلول‌های کشت داده شده/ تعداد کلنی های شمارش شده) = راندمان کشت (٪)

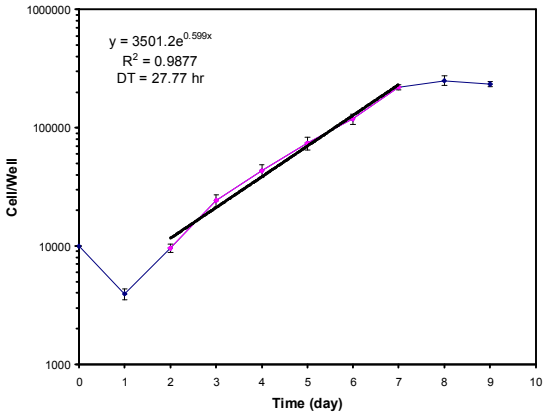
در کلیه مراحل آزمایش، پس از تبدیل اسفرویید‌ها به سلول‌های تکی و پیش از انجام آزمون سنجش توانایی کلنی زایی، Viability سلول‌ها اندازه‌گیری شد که در تمام مراحل این مقدار بیش از ۹۴٪ بود.

تجزیه و تحلیل آماری: از آزمون One way anova، مقادیر P-valueنمونه ها محاسبه و مقایسه شدند. نمودارها و محاسبات آماری در این پژوهش به کمک نرم افزار کامپیوتری Excel 2003 انجام شده است.

یافته‌ها

کشت سلول‌های U87MG به صورت تک لایه و رسم منحنی رشد سلولی (Growth Curve): جهت بررسی اثر داروها در پرتودرمانی گلیوما، منحنی رشد سلول‌های U87MG در مقیاس نیمه لگاریتمی به‌صورت تعداد سلول بر حسب زمان در طی ۹ روز ترسیم شد. در منطقه خطی منحنی یا فاز لگاریتمی، شیب منحنی محاسبه شد که معادل ۰/۸۸±۲۷/۷۷ ساعت بود. شکل‌های شماره ۱ و ۲ به‌ترتیب منحنی رشد و شکل ظاهری سلول‌های U87MG را در مدل کشت تک لایه نشان می‌دهد.

بررسی میزان آسیب های وارد شده به سلول‌های U87MG در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با IUdR و متوکسی آمین و متوکسی استرادیول: برای بررسی آسیب‌های وارده به رده سلولی U87MG در مدل کشت اسفرویید، تیمار اسفرویید‌ها 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 اسفرویید[5] (۶۷ ساعت) [۶] اول، ۷ گروه از اسفرویید‌ها تحت تیمار دارویی با 2ME2 (۲۵۰µM) قرار گرفته و یک گروه به‌عنوان گروه کنترل محسوب گردید. این تیمار برای غیرفعال‌کردن و مهار پروتئین‌های HIF-1α که در مدت تشکیل اسفرویید‌های با این قطر بیان شده‌اند، صورت گرفت. بعد از ۶۷ ساعت که سلول ها، 2ME2 اولیه را برداشت کردند، در مرحله بعد هفت 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 (۱µM) [۱۳] و متوکسی آمین (۶mM) [۶] و متوکسی استرادیول (۲۵۰µM) قرار گرفتند.



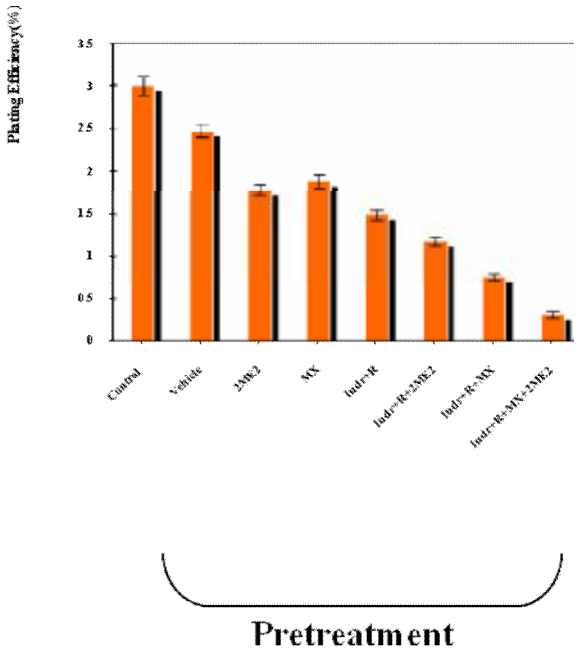
شکل ۱- منحنی رشد سلول های U87MG (تعداد سلول بر حسب زمان). جهت تعیین زمان دو برابر شدن سلول‌ها، خطی به بخش لگاریتمی منحنی منطبق شده است (خط مشکی پررنگ) و DT سلول ها از روی شیب خط تعیین شد (آزمایش سه بار تکرار شده و از انحراف معیار میانگین (SEM) سه بار تکرار استفاده شده است).

۱- vehicle. ۲- تیمار شده با 2ME2 طی یک VDT. ۳- تیمار شده با MX طی یکVDT. ۴- تیمار شده با IUdR طی یک VDT و سپس تابش پرتو گامای کبالت۶۰. 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 کبالت۶۰ . ۷- تیمار شده با 2ME2 ، MX ، IUdR طی یک VDT و سپس تابش پرتو گامای کبالت ۶۰. پس از پرتودهی نمونه ها با پرتو گامای ^{60}Co، درصد سلول‌های زنده و میزان آسیب‌های سیتوتوکسیک

شکل ۲- شکل ظاهری سلول‌های U87 MG در کشت تک لایه با بزرگ نمایی ۱۰x

[1]- Volume Doubling Time (VDT)

وارد شده به سلول‌ها بررسی شد. شکل شماره ۳ نشان دهندهٔ درصد راندمان کشت به‌دست آمده از نمونه‌های مختلف تحت تیمار دارویی و پرتودهی سلول‌های منفرد حاصل از اسفروییدهای روز بیست و چهارم می‌باشد. همان‌طورکه 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 ($p\leq ۰/۰۰۱$) که علت این افزایش آسیب در گروه vehicle نسبت به کنترل آپوپتوز سلول‌های گلیوما می باشد. همچنین گروه تیمار شده با IUdR + پرتودهی اختلاف معنی‌داری را با vehicle ($p\leq ۰/۰۰۱$) 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 می باشد [۶]. از طرفی گروه تیمار شده با 2ME2 + IUdR + پرتودهی، دارای اختلاف معنی‌داری با گروه IUdR+ پرتودهی ($p\leq ۰/۰۵$) می‌باشد. از آنجایی که تیمار اولیه با 2ME2 باعث مهار بیان و غیرفعال‌کردن پروتئین های HIF-1α شده است، سلول‌ها توانسته‌اند IUdR را برداشت کنند و نسبت به پرتو حساس‌تر شوند. گروه MX + IUdR + پرتودهی نیز اختلاف معنی‌داری را با گروه IUdR + پرتودهی ($p\leq ۰/۰۰۱$) 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 2ME2 + MX + IUdR + پرتودهی نیز دارای اختلاف معنی‌داری با گروه MX + IUdR +پرتودهی



شکل۳- نمودار راندمان کشت به دست آمده از سلول‌های U87MG حاصل از کشت اسفرویید 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).

($p\leq ۰/۰۰۱$) است که نشان می‌دهد متوکسی‌آمین و متوکسی استرادیول با هم به شکل معنی داری باعث افزایش صدمات ناشی از اثر توأم IUdR و کبالت ۶۰ شده‌اند.

نتیجه‌گیری

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 می باشند. 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-1α با افزایش رشد اسفروییدهای توموری چند سلولی افزایش می‌یابد که باعث توقف سلول‌ها در فاز G_0 می‌شود [۱۴]. آزمایشات بسیاری نشان داده است که بیان پروتئین HIF-1α یک نقش تنظیم‌کنندگی و کلیدی در مهار رشد سلول‌ها، در ارتباط با حفظ و نگهداری سلول‌ها در فاز خاموش G_0/G_1 از چرخه سلولی ایفا می‌کند که ممکن است باعث به هم زدن پایداری سلول‌های اندوتلیال شود [۱۵]. به‌دلیل نقش HIF-1α در چندین واقعه کلیدی که در پیشرفت سرطان اتفاق می‌افتد، این پروتئین یک هدف مولکولی مهم در درمان سرطان است.

٢- متوکسی استرادیول یک متابولیت طبیعی از استرادیول همراه با فعالیت‌های ضدرگ‌زایی و ضد توموری می‌باشد. مکانیزم‌های 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 [١۶].

نتایج به‌دست‌آمده از آزمون سنجش توانایی کلنی‌زایی در شکل شماره ٣ 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 اسفرویید، 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 اسفرویيدها با 2ME2، پروتئین‌های HIF-1α که در مدت تشکیل اسفرویيدهای با قطر ٣۵٠ میکرون بیان شده‌اند، غیرفعال شده، سلول‌های هیپوکسیک 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 سدکردن مسیر BER که عمده‌ترین مسیر ترمیم صدمات ایجاد شده به دنبال سمیت‌زایی و حساسیت‌زایی پرتوی با IUdR است موجب افزایش صدمات DNA در اسفرویيدهای گلیوما گردیده است.

با وجود آنکه شکی نیست که متوکسی‌آمین مانع ترمیم صدمات IUdR می‌گردد ولی اخیراً محققان با انجام آزمایشات فلوسایتومتری و سنجش وسترن بلات بر روی میزان جذب IUdR متوجه شدند که میزان جذب IUdR در حضور متوکسی آمین 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 هاله‌ای از ابهام است اما می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش جذب از یک سو و مهار فرایند ترمیمی BER توسط متوکسی آمین از سوی دیگر، موجب افزایش هرچه بیشتر صدمات پرتوی می‌گردد.

همان‌طورکه از پیش گفته شد با افزایش اندازه تومورها، سلول‌های موجود در فاز G_o مشکلی جدی را در درمان ایجاد می‌کنند چرا که قادر به برداشت دارو نیستند. اما همان‌طور که در شکل شماره ٣ 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-1α توسط 2ME2 می‌باشد. با مهار بیان این پروتئین‌ها سلول‌های هایپوکسیک توانسته‌اند فاز G_o 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 توافق با اثرات آن روی میکروتوبول‌ها، آپوپتوز و مهار رگ‌زایی می شود، و این مسئله با تغییر در بیان HIF-1α 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، هپاتوما 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-1α نیز بستگی داشته باشد [١٧].

همچنین با توجه به شکل شماره ٣ مشاهده می شود که متوکسی‌استرادیول و متوکسی‌آمین در حضور IUdR و پس از پرتودهی دارای اثرات هم افزایی هستند. چرا که گروه تیمار شده با 2ME2 و MX و IUdR به‌همراه پرتودهی اختلاف معنی داری 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 می شود، از سویی دیگر با مهار بیان پروتئین‌های HIF-1α به‌وسیله 2ME2 که مسئول توقف سلول‌ها در فاز خاموش (G_o) است، میزان برداشت IUdR بیشتر شده و به این ترتیب میزان صدمات پرتوی افزایش می‌یابد.

منابع

1. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. The Cancer Care Ontario Practice Guidelines Institude Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for neerly 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 Radiant 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. Cytotogenic 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-1α 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, Diapenzieri 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. Moberry 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 1α, Tumor growth and angiogenesis and augments paxitaxel efficacy in head and nead squamous cell carcinoma.J Clinical Cancer Research 2004; 10(24): 8665-73.