تحقیقی

اثر والپروئیک اسید و پرتودرمانی بر زیست‌پذیری رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

همت آقاگل‌زاده حاجی[۱]، دکتر علیرضا خوش‌بین خوش‌نظر[۲]، رقیه قرائی[۳]، بیتا جوان[۴]، دکتر جهانبخش اسدی*[۵]

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان. ۲- دانشیار، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان. ۳- کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان. ٤- دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان. ۵- استادیار، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، مرکز اختلالات متابولیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان.

چکیده

زمینه و هدف : *والپروئیک اسید یک مهار کننده هیستون داستیلاز است که در درمان صرع و انواع خاصی از افسردگی به کار می‌رود. اخیراً این ترکیب به عنوان یک عامل ضدسرطان مورد بررسی قرار گرفته که می‌تواند به تنهایی و یا در ترکیب با سایر درمان‌های رایج سرطان از جمله شیمی‌درمانی و پرتودرمانی به‌کار رود. این مطالعه به منظور تعیین اثر والپروئیک اسید و پرتودرمانی بر زیست‌پذیری رده سلولی MCF-7 سرطان پستان در محیط کشت سلولی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی - تحلیلی سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف والپروئیک اسید به تنهایی و در ترکیب با دوزهای مختلف پرتودرمانی تیمار و سپس انکوبه شدند. پس از بررسی سمیت سلولی با تست رنگ‌آمیزی نوترال رد، نزدیک ترین نتایج به LD50 انتخاب شدند. سپس سلول‌ها تحت اثر ۳ غلظت والپروئیک اسید (۲، ۸ و ١٦ میلی‌مولار) و دوز Gy ٤ پرتودرمانی قرار گرفتند و زیست‌پذیری سلول‌ها با رنگ‌آمیزی trypan blue بررسی شد.*

یافته‌ها : *نزدیک‌ترین غلظت‌ها به LD50 از بین دوزهای ۱، ۲، ٤، ۸، ١٦، ۳۲، ٦٤ و ۱۲۸ میلی‌مولار والپروئیک اسید در کاربرد ترکیبی با دوزهای مختلف پرتودرمانی ۰/۵، ۲، ٤، ٦ و ۸ گری غلظت‌های ۲، ۸ و ١٦ میلی‌مولار والپروئیک اسید و دوز Gy ٤ پرتودرمانی بود. همچنین کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها به غلظت والپروئیک اسید وابسته بود (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *والپروئیک اسید هم به تنهایی و هم در ترکیب با پرتودرمانی، باعث کاهش معنی‌داری در زیست‌پذیری سلول‌ها می‌شود. اگرچه در کاربرد ترکیبی اثر فزاینده بر کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها دارد.*

کلید واژه‌ها : *سرطان پستان ، رده سلولی MCF-7 ، والپروئیک اسید ، پرتودرمانی ، زیست پذیری*

* نویسنده مسؤول : دکتر جهانبخش اسدی ، پست الکترونیکی ja_asadi52@yahoo.com

نشانی : گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، تلفن ۰۱۷۱-٤٤٢١٦٥١، نمابر ٤٤٤٠٢٢٥

وصول مقاله : ۹۲/۷/۸ ، اصلاح نهایی : ۹۲/۹/۲ ، پذیرش مقاله : ۹۲/۹/۱۷

مقدمه

سرطان پستان بیماری چندعاملی و پیچیده‌ای است که عوامل ژنتیکی و محیطی زیادی در آن دخالت دارد. شانس ابتلا به سرطان پستان با افزایش سن بالا می‌رود. علاوه بر این جنسیت مونث عامل خطر اصلی برای ابتلا به سرطان پستان است. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان بعد از سرطان غیرملانومی پوست و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان پس از سرطان ریه است. احتمال ابتلای زنان به سرطان مهاجم پستان ۱ به ۸ (۱۳ درصد زنان) است (۱).

امروزه برای درمان سرطان پستان از روش‌های مختلفی مانند جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی استفاده می‌شود (۲). پرتودرمانی یکی از گسترده‌ترین روش‌های به‌کار رفته در درمان سرطان به‌شمار می‌رود (۳و۴). این روش اغلب پس از جراحی برای سرطان پستان برای از بین بردن موضعی سلول‌های سرطانی به‌کار می‌رود. به دلیل توانایی پرتوهای یونیزان در ایجاد مرگ سلولی، از آنها برای درمان سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. به‌طوری که پرتودرمانی یکی از روش‌های مؤثر در درمان انواع سرطان است. در پرتودرمانی با تابش پرتوهای گاما و یا ایکس به سلول‌های سرطانی، تومور از بین می‌رود (۲). با این وجود، پرتودرمانی بعد از جراحی به عنوان دومین روش درمان سرطان به‌کار برده می‌شود و از آنجا که این روش می‌تواند به سلول‌های مجاور نیز آسیب برساند و همچنین برخی توده‌های سرطانی به آن پاسخ نمی‌دهند؛ بررسی‌هایی

برای کارایی بیشتر این روش درمانی انجام شده است (۵).

به‌کار بردن عوامل شیمیایی که بتوانند سلول‌های سرطانی را به اثرات سمی پرتو یونیزان حساس کنند؛ می‌تواند در اثربخشی بیشتر این روش درمانی موثر باشند (۶). بازدارنده‌های هیستون داستیلاز (HDIs) از جمله این ترکیبات هستند (۱۰-۷). والپروئیک اسید یک مهارکننده هیستون داستیلاز است که به‌طور موثر در درمان صرع و انواع خاصی از افسردگی به‌کار می‌رود (۶و۱۱و۱۲). این ترکیب به عنوان یک عامل ضدسرطان مورد بررسی قرار گرفته است که می‌تواند هم به تنهایی و هم در ترکیب با سایر درمان‌های رایج سرطان از جمله شیمی‌درمانی و پرتودرمانی نیز به‌کار رود (۱۵-۱۳). با این وجود، برخی مطالعات نشان می‌دهند که والپروئیک اسید اثر محافظتی در برابر آپوپتوز در برخی سلول‌های سرطانی ایجاد می‌کند که هنوز مکانیسم آن به طور دقیق شناخته نشده است (۱۶). با توجه به شیوع گسترده سرطان پستان و اهمیت مقابله با آن و نیز اهمیت پرتودرمانی در درمان این بیماری، لزوم مطالعات بیشتر در جهت کشف داروها و ترکیبات جدید ضدسرطانی که بتوانند کارایی چنین درمانی را افزایش دهند و تاحد امکان از عوارض جانبی آن بکاهند؛ مشخص می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر والپروئیک اسید و پرتودرمانی بر زیست‌پذیری رده سلولی MCF-7 سرطان پستان در محیط کشت سلولی انجام شد.

روش بررسی

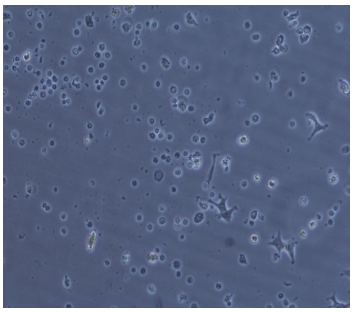
در این مطالعه توصیفی - تحلیلی رده سلولی MCF-7 (NCBI C135) که یک نوع رده سلولی داکتال کارسینوما بوده و ۸۵درصد از سرطان پستان از این نوع رده سلولی است؛ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت در حال رشد (in growing) خریداری شد. این مطالعه در آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان در سال ۱۳۹۲ انجام شد.

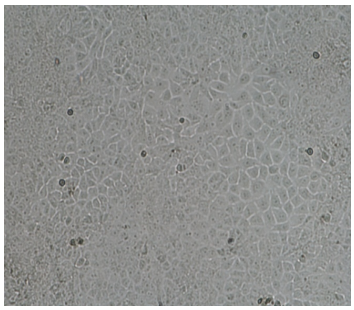
پس از تعویض محیط اولیه، در محیط کشت DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت داده شد. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد قرار گرفتند. قبل از پاساژ دادن و همچنین انتقال به پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای، سلول‌ها در فلاسک T25 کشت داده شدند و هنگامی که بیش از ۷۰ درصد از کف فلاسک را پر کردند؛ توسط تریپسین- EDTA ۰/۲۵ درصد از کف ظرف جدا شدند. بعد از شمارش زیر میکروسکوپ نوری توسط لام نئوبار تعداد ۵۰۰۰۰ سلول به هر یک از خانه‌های پلیت انتقال داده شد.

مطالعه آزمایشی: معیار و مبنای انتخاب مناسب‌ترین دوز براساس مطالعات مشابه در این زمینه و مطالعه آزمایشی (pilot study) (۶) بود. مطالعه با دوزها و غلظت‌های بالا که بتواند حداقل نصف سلول‌ها (LD50) را از بین ببرد؛ شروع شد. سپس غلظت‌ها و دوزهای مختلف بین حداقل (کاهش معنی‌دار تعداد سلول نسبت به ابتدای شروع تیمار کردن) و حداکثر (نصف سلول‌هایی که از بین می‌روند) مورد بررسی قرار گرفت. کاربرد ترکیبی والپروئیک اسید و پرتودرمانی در سه زمان مختلف (پرتودرمانی ۲۴ ساعت قبل از والپروئیک اسید، والپروئیک اسید ۲۴ ساعت قبل از پرتودرمانی و والپروئیک اسید و پرتودرمانی به صورت هم زمان) مورد بررسی قرار گرفت.

انتخاب دوز مناسب پرتودرمانی و غلظت مناسب والپروئیک اسید و زمان مناسب انکوباسیون: ابتدا سلول‌های کشت شده در پلیت‌های ۲۴ خانه براساس مطالعات قبلی (۶و۱۷و۱۸) تحت دوزهای ۰/۵، ۲، ۴، ۶ و ۸ Gy پرتودرمانی قرار گرفتند. برای به دست آوردن غلظت مناسب والپروئیک اسید نیز از غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌مولار به صورت تنها و همزمان با پرتودرمانی استفاده شد. به منظور به دست آوردن زمان مناسب انکوباسیون بعد از تیمار، ابتدا چند غلظت مختلف برای والپروئیک اسید تنها، چند دوز پرتودرمانی تنها، والپروئیک اسید و پرتودرمانی به‌صورت همزمان استفاده شد. نتایج بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که تمام نمونه‌ها به صورت سه بار تکرار مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین سمیت سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی نوترال رد (neutral red) (۱۹) : ابتدا پودر والپروئیک اسید در محیط کشت DMEM بدون سرم جنین گاوی به‌صورت سوسپانسیون آماده شد و توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل گردید. سپس رقت‌های مورد نیاز تهیه گردید. برای انجام این تست در پلیت‌های ۲۴ خانه به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. برای هر گروه ۳ چاهک در نظر گرفته شد. برای انجام این تست طبق روش‌های گفته شده، محلول‌های رنگ و رنگ‌بر از قبل آماده گردید. ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها بر داشته شد. هر چاهک با حدود ۲۰۰ میکرولیتر PBS شستشه شد. سپس PBS به آرامی بربرداشته شد. به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ۳۰۰ میکرولیتر رنگ 1X نوترال رد اضافه شد. به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس در زیر هود رنگ خارج شد و هر چاهک با حدود ۲۰۰ میکرولیتر PBS شسته و به آرامی برداشته شد. سپس برای قرائت نتایج با اسپکتروفتومتر به هر چاهک یک میلی‌لیتر محلول رنگ‌بر اضافه شد. برای خواندن طول موج دستگاه اسپکتروفتومتر روی ۵۴۰ نانومتر تنظیم شد. با محلول رنگ‌بر دستگاه کالیبر شد و طول موج هر نمونه مقابل بلانک (محلول رنگ‌بر) قرائت شد. این تست در ۴ گروه (والپروئیک اسید تنها با غلظت‌های مختلف،


ب


الف

شکل ۱ : تصویر سلول قبل (الف) و بعد از (ب) تیمار با والپروئیک اسید و پرتودرمانی، بزرگ نمایی x ۱۰

والپروئیک اسید با دوز Gy ۴ پرتودرمانی، پرتودرمانی تنها با دوز Gy ۴ و گروه کنترل برای مقایسه)، انجام شد. نتایج در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و انکوباسیون مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین زیست پذیری سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی trypan blue : برای بررسی تعداد سلول‌های زنده و مرده، 10^6 سلول به‌صورت سوسپانسیون در هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مکعب ریخته شد. این تست در ۴ گروه والپروئیک اسید تنها با غلظت‌های مختلف، والپروئیک اسید با دوز Gy ۴ پرتودرمانی، پرتودرمانی تنها با دوز Gy ۴ و گروه کنترل برای مقایسه انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، گروه‌های والپروئیک اسید تنها با غلظت‌های ذکر شده تحت تیمار قرار گرفتند. بلافاصله گروه‌های پرتودرمانی تحت تاثیر دوز Gy ۴ پرتودرمانی قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها پس از دوبار شستشو با PBS، تریپسنه شده و سپس با محیط کشت کامل (حاوی سرم جنین گاوی) خنثی شدند. برای شمارش سلول‌ها ۵۰ میکرولیتر از سلول‌های خنثی شده با ۵۰ میکرولیتر مخلوط گردید و سپس زیر لام نئوبار شمارش شدند و با استفاده از فرمول زیر درصد توانایی زیست‌پذیری سلول‌ها محاسبه گردید.

درصد زیست‌پذیری سلول‌ها = تعداد سلول‌های زنده تقسیم بر تعداد سلول‌های کل ضرب در عدد ۱۰۰

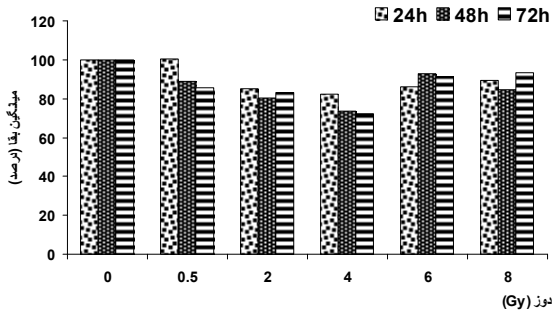
داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-16 و آزمون‌های Tukey ، Independent t ، ANOVA و Bonferroni تجزیه وتحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

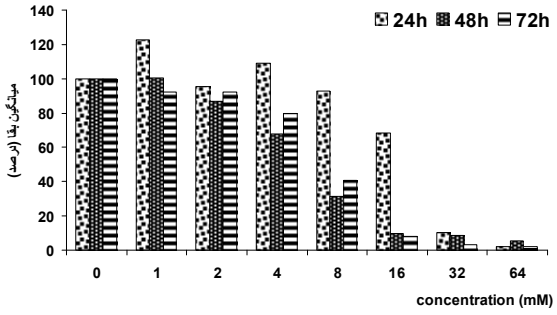
تصویر سلول قبل و بعد از تیمار با والپروئیک اسید و پرتودرمانی در شکل یک قابل مشاهده است.

نتایج سمیت سلولی در کاربرد والپروئیک اسید: در کاربرد دوزهای مختلف پرتودرمانی نزدیک‌ترین دوز به LD50 دوز Gy ۴ و مناسب‌ترین زمان انکوباسیون، ۷۲ ساعت تعیین شد (نمودار یک). نزدیک‌ترین غلظت‌ها به LD50 ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون بودند (نمودار ۲).

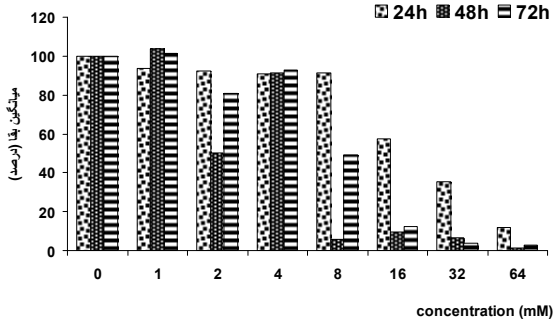
نتایج سمیت سلولی در کاربرد ترکیبی والپروئیک اسید در غلظت‌های مختلف و پرتودرمانی در دوز Gy ۴ و در زمان‌های متفاوت: غلظت‌های ۲، ۸ و ۱۶ میلی‌مولار والپروئیک اسید در کاربرد همزمان با دوز Gy ۴ پرتودرمانی بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون به LD50 نزدیک‌تر بود (نمودار ۳).



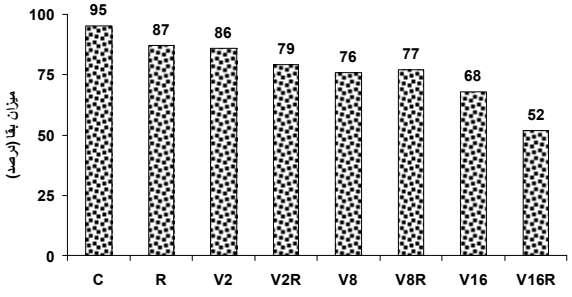
نمودار ۱ : سمیت سلولی در دوزهای ۰/۵، ۲، ٤، ٦ و ۸ گری پرتودرمانی در سه زمان ٢٤، ٤٨ و٧٢ ساعت



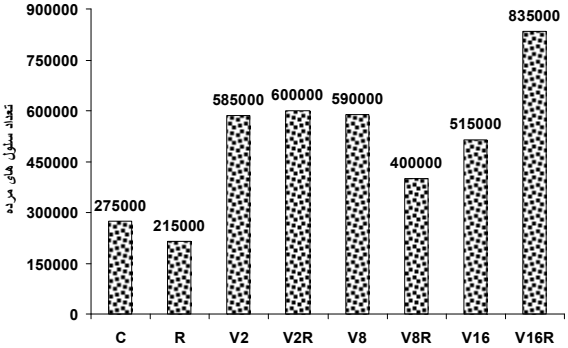
نمودار ۲ : سمیت سلولی در غلظت‌های مختلف والپروئیک اسید در سه زمان ٢٤، ٤٨ و٧٢ ساعت



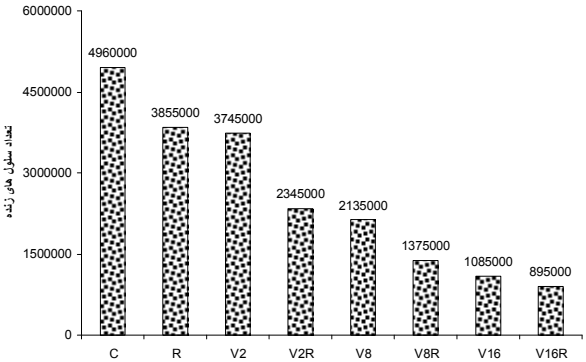
نمودار ۳ : سمیت سلولی در کاربرد همزمان والپروئیک اسید و پرتودرمانی در سه زمان ٢٤، ٤٨ و٧٢ ساعت



نمودار ٤ : درصد بقاء سلولی در کاربرد همزمان والپروئیک اسید و پرتو درمانی
کنترل (بدون تیمار)، R (پرتو درمانی)، V2 (والپروئیک اسید ۲Mm)، V2+R (والپروئیک اسید Mm ۲ و پرتو درمانی)، V8 (والپروئیک اسید Mm ۸)، V8+R (والپروئیک اسید Mm ۸ و پرتودرمانی)، V16 (والپروئیک اسید Mm ١٦)، V16+R (والپروئیک اسید Mm ١٦ و پرتودرمانی)



نمودار ٥ : تعداد سلول‌های مرده در کاربرد همزمان والپروئیک اسید و پرتودرمانی
کنترل (بدون تیمار)، R (پرتو درمانی)، V2 (والپروئیک اسید ۲Mm)، V2+R (والپروئیک اسید Mm ۲ و پرتو درمانی)، V8 (والپروئیک اسید Mm ۸)، V8+R (والپروئیک اسید Mm ۸ و پرتودرمانی)، V16 (والپروئیک اسید Mm ١٦)، V16+R (والپروئیک اسید Mm ١٦ و پرتودرمانی)



نمودار ٦ : تعداد سلول‌های زنده در کاربرد همزمان والپروئیک اسید و پرتودرمانی
کنترل (بدون تیمار)، R (پرتو درمانی)، V2 (والپروئیک اسید ۲Mm)، V2+R (والپروئیک اسید Mm ۲ و پرتو درمانی)، V8 (والپروئیک اسید Mm ۸)، V8+R (والپروئیک اسید Mm ۸ و پرتودرمانی)، V16 (والپروئیک اسید Mm ١٦)، V16+R (والپروئیک اسید Mm ١٦ و پرتودرمانی)

نتایج تست زیست‌پذیری سلول‌ها در کاربرد ترکیبی والپروئیک اسید و پرتودرمانی با استفاده از رنگ‌آمیزی trypan blue بعد از انکوباسیون ۴۸ ساعته در گروه‌های مختلف: با افزایش غلظت والپروئیک اسید در دوز ثابت پرتودرمانی Gy ۴ درصد بقاء سلولی کاهش پیدا یافت (نمودار ۴). تمام گروه‌ها نسبت به گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۰۱).

نمونه کنترل کمترین و نمونه V16+R بیشترین تعداد سلول‌های مرده را داشتند (نمودار ۵). تمام گروه‌ها نسبت به گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۰۲).

تعداد سلول‌های زنده با افزایش غلظت والپروئیک اسید در دوز ثابت پرتودرمانی به‌ترتیب کاهش نشان دادند (نمودار ۶). تمام گروه‌ها نسبت به گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۰۳).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه والپروئیک اسید هم به تنهایی و هم در ترکیب با پرتودرمانی، باعث کاهش معنی‌داری در زیست‌پذیری سلول‌ها گردید. همچنین کاربرد ترکیبی این دو عامل اثر افزایشی بر کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها نشان داد.

در این مطالعه در کاربرد والپروئیک اسید تنها، وابسته به غلظت و زمان در معرض قرار گرفتن، نتایج ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون به LD50 نزدیک‌تر بود. در همین راستا در مطالعه Byun و همکاران درمان با والپروئیک اسید منجر به کاهش معنی‌داری در توانایی تشکیل کلونی و تهاجم سلولی گردید و اثر این دارو در انواع مختلف سلول متفاوت بود (۲۰). همچنین این نتایج همسو با نتایج مطالعه Arakawa و همکاران است که نشان داد استفاده از والپروئیک اسید می‌تواند با توقف چرخه سلولی در فاز G1، تکثیر سلولی را سرکوب کند. این اثر بخشی والپروئیک اسید در سلول‌های سرطانی حساس به استروژن همانند آدنوکارسینومای سلول‌های اپی‌تلیایی پستان (MCF-7) بیشتر از سلول‌هایی بود که حساس به استروژن نبودند (۲۱). در مقابل، در مطالعه Vandermeers و همکاران، نتایج نشان داد که کاربرد همزمان والپروئیک اسید و داروهای ضدسرطان آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی مختلف القا می‌کند؛ اما هیچ‌کدام از آنها به تنهایی نمی‌توانند به‌طور کارآمدی آپوپتوز را ایجاد کنند (۲۱و۲۲). در مطالعه حاضر بررسی با دوزهای مختلف پرتودرمانی به‌صورت تنها در سه زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت و نتایج نشان داد که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون نزدیک‌ترین دوز به LD50، دوز Gy ۴ است. در همین راستا در مطالعه Swati و همکاران، نتایج کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها را وابسته به دوز پرتودرمانی نشان داد (۲۳). مکانیسم احتمالی که از طریق آن

پرتودرمانی اکثر سلول‌های توموری را از بین می‌برد از طریق مرگ کلوژنیک است (۲۴).

بررسی سمیت سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی نوترال رد نشان داد که کاربرد همزمان غلظت‌های ۲، ۸ و ۱۶ میلی‌مولار والپروئیک اسید با دوز Gy ۴ پرتودرمانی و ۴۸ ساعت انکوباسیون بعد از تیمار نزدیک‌ترین نتایج را نسبت به LD50 از خود نشان داد. احتمالاً مکانیسمی که از طریق آن والپروئیک اسید به‌نظر می‌رسد باعث افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به اثرات پرتویونیزان می‌شود؛ شامل متوقف کردن فعالیت هیستون داستیلازی است که منجر به هیپراستیلاسیون هیستون‌های مرکزی و در نهایت شل‌تر شدن ساختار کروماتین است (۲۵).

برای تعیین میزان زیست‌پذیری سلول‌ها از رنگ‌آمیزی trypan blue استفاده شد و نتایج نشان داد که در کاربرد جداگانه و ترکیبی این دو عامل، کاربرد همزمان پرتودرمانی و والپروئیک اسید به صورت وابسته به غلظت، غلظت‌های ۲، ۸ و ۱۶ میلی‌مولار والپروئیک اسید و دوز Gy ۴ پرتودرمانی و ۴۸ ساعت انکوباسیون بعد از تیمار، باعث کاهش معنی‌دار زیست‌پذیری سلول‌ها گردید. در مطالعه Camphausen و همکاران بر روی سلول‌های نوروبلاستوم مغز رده سلولی K562 نشان داده که ۲۴ ساعت انکوباسیون بعد از تیمار با والپروئیک اسید باعث افزایش حساسیت این سلول‌ها به اثرات اشعه یونیزان می‌شود و این افزایش حساسیت به پرتو به مرگ وابسته به آپوپتوز نسبت داده شد (۲۶).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که والپروئیک اسید هم به تنهایی و هم در ترکیب با پرتودرمانی، احتمالاً از طریق هیپراستیله کردن هیستون‌های مرکزی باعث کاهش معنی‌داری در زیست‌پذیری سلول‌ها می شود. همچنین کاربرد ترکیبی این دو عامل اثر افزایشی بر کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها نشان داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای همت آقاگل‌زاده حاجی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود. لازم به ذکر است این پایان‌نامه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۹۰۱۰۱۳۰۲۱۰) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان به انجام رسید.

References

1. Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. N Engl J Med. 2000 Feb;342(8):564-71.

2. Hosseinimehr SJ. Trends in the development of radioprotective agents. Drug Discov Today. 2007 Oct;12(19-20):794-805.

3. Wachsberger P, Burd R, Dicker AP. Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: exploring mechanisms of interaction. Clin Cancer Res. 2003 Jun;9(6):1957-71.

4. Saito Y, Suzuki Y, Okamura T, Tsuda B, Terada M, Terao M, Tokuda Y. [Breast cancer]. Gan To Kagaku Ryoho. 2010 Apr;37(4):613-6. [Article in Japanese]

5. Dibyajyoti S, Tarashankar M, Mayukh J, Supradip M. Cancer treatment strategy-an overview. Asian J Pharm Tech. 2011;1(2):28-33.

6. Karagiannis TC, Kn H, El-Osta A. The epigenetic modifier, valproic acid, enhances radiation sensitivity. Epigenetics. 2006 Jul-Sep;1(3):131-7.

7. Sonnemann J, Kumar KS, Heesch S, Müller C, Hartwig C, Maass M, et al. Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells. Int J Oncol. 2006 Mar; 28(3):755-66.

8. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. J Clin Oncol. 2009 Nov;27(32):5459-68.

9. Jung M, Velena A, Chen B, Petukhov PA, Kozikowski AP, Dritschilo A. Novel HDAC inhibitors with radiosensitizing properties. Radiat Res. 2005 May;163(5):488-93.

10. Chung YL, Lee MY, Pui NN. Epigenetic therapy using the histone deacetylase inhibitor for increasing therapeutic gain in oral cancer: prevention of radiation-induced oral mucositis and inhibition of chemical-induced oral carcinogenesis. Carcinogenesis. 2009 Aug;30(8):1387-97.

11. Rabbani-Chadegani A, Chamani E, Hajihassan Z. The effect of vinca alkaloid anticancer drug, vinorelbine, on chromatin and histone proteins in solution. Eur J Pharmacol. 2009 Jun; 613(1-3):34-8.

12. Mologni L, Cleris L, Magistroni V, Piazza R, Boschelli F, Formelli F, et al. Valproic acid enhances bosutinib cytotoxicity in colon cancer cells. Int J Cancer. 2009 Apr;124(8):1990-6.

13. Harikrishnan KN, Karagiannis TC, Chow MZ, El-Osta A. Effect of valproic acid on radiation-induced DNA damage in euchromatic and heterochromatic compartments. Cell Cycle. 2008 Feb; 7(4):468-76.

14. Debeb BG, Xu W, Mok H, Li L, Robertson F, Ueno NT, et al. Differential radiosensitizing effect of valproic acid in differentiation versus self-renewal promoting culture conditions. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010 Mar;76(3):889-95.

15. Karagiannis TC, El-Osta A. Modulation of cellular radiation responses by histone deacetylase inhibitors. Oncogene. 2006 Jun; 25(28):3885-93.

16. Uo T, Veenstra TD, Morrison RS. Histone deacetylase inhibitors prevent p53-dependent and p53-independent Bax-mediated neuronal apoptosis through two distinct mechanisms. J Neurosci. 2009 Mar; 29(9):2824-32.

17. Rezacova M, Zaskodova D, Vavrova J, Vokurkova D, Tichy A. Antileukemic activity of the combination of ionizing radiation with valproic acid in promyelocytic leukemia cells HL-60. Neoplasma. 2008;55(6):519-25.

18. Chinnaiyan P, Cerna D, Burgan WE, Beam K, Williams ES, Camphausen K, et al. Postradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid. Clin Cancer Res. 2008 Sep; 14(17):5410-5.

19. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for

the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nat Protoc. 2008; 3(7):1125-31.

20. Byun SS, Kim FJ, Khandrika L, Kumar B, Koul S, Wilson S, Koul HK. Differential effects of valproic acid on growth, proliferation and metastasis in HTB5 and HTB9 bladder cancer cell lines. Cancer Lett. 2009 Aug;281(2):196-202.

21. Arakawa Y, Saito S, Yamada H, Aiba K. Simultaneous treatment with camptothecin and valproic acid suppresses induction of Bcl-X(L) and promotes apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. Apoptosis. 2009 Sep;14(9):1076-85.

22. Vandermeers F, Hubert P, Delvenne P, Mascaux C, Grigoriu B, Burny A, et al. Valproate, in combination with pemetrexed and cisplatin, provides additional efficacy to the treatment of malignant mesothelioma. Clin Cancer Res. 2009 Apr;15(8):2818-28.

23. Swati G, Mansoor MA, Kaushala PM. Enhancement of gamma radiation-induced cytotoxicity of breast cancer cells by curcumin. Mol Cell Pharmacol. 2009;1(4):208-17.

24. Howell SB. Resistance to apoptosis in prostate cancer cells. Mol Urol. 2000;4(3):225-9.

25. Flørenes VA, Skrede M, Jørgensen K, Nesland JM. Deacetylase inhibition in malignant melanomas: impact on cell cycle regulation and survival. Melanoma Res. 2004 Jun;14(3): 173-81.

26. Camphausen K, Cerna D, Scott T, Sproull M, Burgan WE, Cerra MA, et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid. Int J Cancer. 2005 Apr; 114(3):380-6.

Original Paper

Effect of valproic acid and radiotherapy on viability of MCF-7 breast cancer cell line

**Aghagolzade Haji H (M.Sc)[1], Khoshbin Khoshnazar AR (Ph.D)[2]
Gharaei R (M.Sc)[3], Javan B (M.Sc)[4], Asadi J (Ph.D)*[5]**

[1]M.Sc in Clinical Biochemstry, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran. [2]Associate Professor, Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran. [3]M.Sc in Molecular Biology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran. [4]Ph.D Candidate in Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran. [5]Assistant Professor, Department of Biochemistry and Biophysics, Metabolic Disorders Research Center, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Valproic acid is used in the epilepsy, bipolar and migraine therapy. As a histone deacetylase inhibitor, Valproic acid has been recently under investigation in cancer treatment, either alone or in combination with either chemotherapy or radiotherapy. This study was done to determine the effect of Valproic acid and radiotherapy on viability of MCF-7 breast cancer cell line.

Methods: In this descriptive - analytic study, MCF-7 cell line was obtained from the Iranian Pasteur Institute. The cells were treated and incubated by different concentrations of Valproic acid (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 mM) either alone or in combination with various dosages (0 .5, 2, 4, 6 and 8 Gray) of radiotherapy. After cell viability assay, using the Neutral red staining, the most nearest results to LD50 were selected. Cell viability was evaluated with trypan blue staining.

Results: The most nearest concentrations of LD50 was doses of 2, 8 and 16 mM of valproic acid and dosage of Gray 4 of radiation. There was a significant dose-dependent correlation between reduction of cell viability with valproic acid concentration ($P<0.05$).

Conclusion: Valproic acid, either alone or combination with radiotherapy caused a significant decline in the cell viability of MCF-7 breast cancer cell line.

Keywords: Breast cancer, MCF-7 cell line, Valproic acid, Radiotherapy, Cell viability

*** Corresponding Author: Asadi J (Ph.D), E-mail: ja_asadi52@yahoo.com**

Received 30 Sep 2013 **Revised** 23 Nov 2013 **Accepted** 8 Dec 2013

This paper should be cited as: Aghagolzade Haji H, Khoshbin Khoshnazar AR, Gharaei R, Javan B, Asadi J. [Effect of valproic acid and radiotherapy on viability of MCF-7 breast cancer cell line]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 16(3): 49-55. [Article in Persian]