Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2022 / Vol 24 / No 2

OPEN ACCESS

Original Paper

Synergistic Effect of Dexamethasone and Diclofenac on Viability of K562 Cells

Hasan Tahazadeh (M.Sc)[1], **Yaghub Pazhang (Ph.D)***[2]

1 M.Sc in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

2 Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Background and Objective: Chronic myeloid leukemia is one of the most well-known types of leukemia. Inflammation is one of the leading causes of cancer; therefore, anti-inflammatory agents are used for reducing and suppressing the growth of cancer cells. Dexamethasone, a cortisol agonist, has anti-inflammatory, anti-tumor, and apoptotic effects. Diclofenac is a cyclooxygenase enzyme inhibitor with anti-inflammatory properties. This study was performed to determine the synergistic effect of diclofenac and dexamethasone on the growth of K562 cancer cells.

Methods: In this descriptive-analytical study, K562 cell line was cultured in RPMI-1640 medium enriched with glutamine, penicillin, and streptomycin. The cytotoxic effects of dexamethasone, diclofenac and their combination (multi-target tracking) were evaluated using MTT assay. Hoechst staining and DNA electrophoresis were carried out to evaluate the occurrence of apoptosis.

Results: Diclofenac, dexamethasone and their combination had cytotoxic effects on the cells at concentrations of 20, 40, 60, and 80 µmol/ml. A significant cytotoxic effect was observed after 72 hours of treatment with different concentrations of the drugs ($P<0.05$). Hoechst staining showed that DNA fragmentation was increased in the treated cells. DNA electrophoresis also showed induction of apoptosis by diclofenac, dexamethasone, and their combination.

Conclusion: The combination of diclofenac and dexamethasone at concentration of 20 µmol/ml is more effective in inducing apoptosis in K562 cells compared with each drug alone.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, Dexamethasone, Diclofenac, Apoptosis, K562 Cell Line

***Corresponding Author:** Yaghub Pazhang (Ph.D), E-mail: y.pazhang@urmia.ac.ir

Received 8 Aug 2021
Final Revised 20 Oct 2021
Accepted 22 Nov 2021
Published Online 17 Oct 2022

Cite this article as: Tahazadeh H, Pazhang Y. [Synergistic Effect of Dexamethasone and Diclofenac on Viability of K562 Cells]. J Gorgan Univ Med Sci. 2022; 24(2): 53-62. [Article in Persian]

© The author(s)

Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

تابستان ۱۴۰۱ / دوره ۲۴ / شماره ۲ (پی در پی ۸۲)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

اثر هم‌افزایی داروهای دگزامتازون و دیکلوفناک بر روی حیات سلول‌های سرطانی رده K562

حسن طه زاده[۱]، دکتر یعقوب پاژنگ*[۲]

[۱] کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. [۲] استادیار بیوشیمی،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *لوسمی میلوئید مزمن از شناخته شده‌ترین انواع لوسمی است. یکی از دلایل ایجاد سرطان التهاب است. عوامل ضدالتهابی می‌توانند رشد سلول‌های سرطانی را کاهش داده یا متوقف کنند. دگزامتازون، یک آگونیست کورتیزول، دارای اثرات ضدالتهابی، ضدتوموری و آپوپتوز است. دیکلوفناک به عنوان مهارگر آنزیم سیکلواکسیژناز، نقش ضدالتهابی دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثر هم‌افزایی داروهای دگزامتازون و دیکلوفناک بر روی حیات سلول‌های سرطانی رده K562 انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی - تحلیلی رده سلولی K562 در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با گلوتامین و پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شد. برای سنجش خصلت سمیت سلولی داروهای دگزامتازون، دیکلوفناک و داروی ترکیبی آنها از روش MTT (Multi-Target Tracking) استفاده شد. برای بررسی وقوع آپوپتوز از رنگ‌آمیزی هوخست و الکتروفورز DNA استفاده گردید.*

یافته‌ها: *دیکلوفناک، دگزامتازون و ترکیب این دو دارو در غلظت‌های ۲۰ ، ۴۰ ، ۶۰ و ۸۰ میکرومول بر میلی‌لیتر دارای اثر سمیت سلولی بودند. اثر سمیت سلولی قابل توجهی پس از ۷۲ ساعت از تیمار با غلظت‌های مختلف داروها مشاهده شد (P<۰/۰۵). رنگ‌آمیزی هوخست نشان داد که قطعه‌قطعه شدن DNA در سلول‌های تحت تیمار افزایش یافته است. همچنین الکتروفورز DNA القاء آپوپتوز توسط دیکلوفناک، دگزامتازون و ترکیب دو دارو را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که داروی ترکیبی با غلظت ۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر به صورت موثری باعث القاء آپوپتوز نسبت به داروهای منفرد می‌شود.*

واژه‌های کلیدی: *لوسمی میلوئید مزمن ، دگزامتازون ، دیکلوفناک ، آپوپتوز، رده سلولی K562*

* نویسنده مسؤول: دکتر یعقوب پاژنگ ، پست الکترونیکی y.pazhang@urmia.ac.ir

نشانی: ارومیه، کیلومتر ۱۱ بلوار دانشگاه، دانشگاه ارومیه، کدپستی ۵۷۵۶۱۵۱۸۱۸، تلفن و نمابر ۰۴۴-۳۱۹۴۴۲۲۹

وصول ۱۴۰۰/۵/۱۷ اصلاح نهایی ۱۴۰۰/۷/۲۸ پذیرش ۱۴۰۰/۹/۱ انتشار ۱۴۰۱/۷/۲۵

مقدمه

میزان وقوع سرطان به طور روزافزون از ۱۰میلیون مورد در سال ۲۰۰۰ به ۱۵ میلیون مورد در سال ۲۰۲۰ در حال افزایش است.[۱] در کشور ما سرطان خون دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است.[۲] لوسمی، سرطان بافت‌های خونساز بدن شامل مغز استخوان و دستگاه لنفاوی بوده و توسط سلول‌های سفید خون و لنف به وجود می‌آید. معمولاً گلبول‌های سفید خونی در صورت نیاز بدن، به طریقی منظم و کنترل شده رشد و تقسیم می‌شوند؛ اما در بیماری لوسمی در این روند اختلال ایجاد شده و رشد سلول‌های خونی از کنترل خارج می‌شوند.[۳]

لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic myeloid leukemia: CML) یکی از شناخته‌شده‌ترین انواع لوسمی است که با تجمع سلول‌های مونوکلونال بالغ، سلول‌هایB از نوع+CD5 در محیط جانبی خون، مغز استخوان و اندام‌های لنفاوی ثانویه تشخیص داده می‌شود.[۴] معمولاً تعداد پلاکت‌ها افزایش یافته، امکان وجود بازوفیلی و بزرگی طحال نیز شایع است. این بیماری به صورت معمول افراد میانسال را درگیر می‌کند و مسؤول ۲۰-۱۵درصد از لوسمی‌های بزرگسالان است. میزان بروز آن تا اواسط دهه پنجم زندگی کندی بوده و در بین ۴۰ تا ۵۰ سالگی میزان بروز بسرعت افزایش می‌یابد.[۵] این بیماری از بیماری‌های مزمن میلوپرولیفراتیو (Myeloproliferative) است که به دلیل موتاسیون اختصاصی در سلول‌های بنیادی چندتوانی مغز استخوان ایجاد می‌شود. سبب اصلی بروز CML را می‌توان جابجایی دوطرفه دو ژنBCR (در سلول‌های خونی چندتوان- کروموزوم ۲۲) و ژنAb1 (کروموزوم ۹) دانست. پیامد این جابجایی پروتوانکوژنی

با عنوان BCR-Ab1 خواهد بود که پروتئین تیروزین کیناز را با نام p210Bcr-Ab1 ایجاد می‌کند. فعالیت پیوسته این تیروزین‌کیناز سبب زیاد شدن بیش از حد سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی و نیز ایجاد اختلالات در روند آپوپتوز این سلول‌ها می‌شود. این بیماری یک بیماری کلونال است که با وجود کروموزوم فیلادلفیا و محصول انکوژنیک آن یعنی BCR-ABL مشخص می‌شود که مسیرهای متعددی را در بقای سلول‌ها، ارتقاء رشد و پیشرفت بیماری فعال می‌کند.[۶] یکی از راهکارهای درمانی سرطان CML استفاده از مهارگرهای این تیروزین‌کیناز مانند ایماتینیب (Imatinib: IMA) است.[۷] ایماتینیب یک مهارکننده تیروزین‌کیناز (TKI) BCR-ABL است که میزان بالایی از پاسخ را تنها برای بیماران CML تازه تشخیص داده شده، نشان می‌دهد و با پیشرفت بیماری نسبت به آن مقاومت ایجاد می‌شود.[۸] مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی لوسمیک (Leukemic stem cells: LSCs) مسؤول مقاومت ایماتینیب و پیشرفت CML هستند.[۹] یکی از رده‌های CML، K562 است[۵و۱۰و۱۱] که رده مطالعه شده در این بررسی است.

آپوپتوز به خودکشی برنامه‌ریزی شده ژنتیکی سلول گفته می‌شود که بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک در ایجاد آن نقش مهمی ایفا می‌کنند. اغلب مولکول‌ها و مسیرهای سیگنالی درگیر در این فرآیند بخوبی شناخته شده‌اند.[۱۲] یکی از ویژگی‌های سلول‌های سرطانی توانایی در گریز از آپوپتوز است که نتیجه آن بلوکه‌کردن مسیر سیگنالی مرگ سلولی است.[۱۳] اختلال در مسیر آپوپتوز هم می‌تواند موجب متاستاز تومور و هم مقاومت به داروهای ضدسرطانی شود. بنابراین، آپوپتوز می‌تواند نقش مهمی در درمان سرطان ایفا کند.[۱۴] به طوری که هدف مهم پیشرفت داروهای ضدسرطانی و شیمی‌درمانی آسان‌کردن آپوپتوز در سلول‌های نئوبلاستیک است.[۱۳] برخلاف بیشتر سرطان‌ها درمان لوسمی دشواری‌هایی دارد. زیرا در این بیماری تومور جامد، توپر و در دسترسی وجود ندارد که پزشک بتواند با جراحی آن را خارج کند. در نتیجه درمان لوسمی پیچیده‌تر از دیگر سرطان‌هاست. بنابراین، پزشکان با انواع داروهای شیمیایی برای درمان این بیماری اقدام می‌کنند. گروهی از این داروها، داروهای گلوکوکورتیکوئیدی (GC) مانند پردنیزولون، دگزامتازون و متیل پردنیزولون است.[۲] این داروها توان تغییر سیگنال در مسیرهای کلیدی بقای سلولی را دارند که می‌تواند منجر به توقف رشد برگشت‌پذیر یا مرگ سلولی در انواع سلول‌های خاص شود. این اثر گلوکوکورتیکوئیدها از راه پیوستن به گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی صورت می‌گیرد.[۱۵] مطالعات نشان می‌دهد که نزدیک ۲۰درصد مرگ‌ومیر ناشی از سرطان با التهاب و عفونت مزمن در مسیر تومورزایی همراه است.[۱۶] یکی از ویژگی‌های خانواده دارویی گلوکوکورتیکوئیدی پیشگیری از التهاب است.[۱۷]

دگزامتازون یکی از داروهای کورتیکواستروئید است که در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله مشکلات روماتیسمی، تعدادی از بیماری‌های پوستی، بیماری‌های مزمن انسدادی ریه، آلرژی‌های شدید، آسم، تورم مغز و همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان سل، در زایمان زودرس و نارسایی قلبی استفاده می‌شود. این دارو دارای اثرات سرکوب ایمنی و ضدالتهابی است. اغلب دگزامتازون برای افراد مبتلا به سرطان که تحت شیمی‌درمانی هستند؛ به‌منظور کاهش عوارض جانبی مانند تهوع استفراغ برخی از داروهای ضدتومور تجویز می‌شود. همچنین این دارو به‌عنوان یک عامل شیمی‌درمانی مستقیم در سرطان خون استفاده می‌شود.[۱۸] دیکلوفناک یکی از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی است که به درمان درد آرتروز روماتوئید و سایر بیماری‌های اسکلتی عضلانی، میگرن، تب، نقرس حاد و درد پس از عمل استفاده می‌شود. این دارو توسط Ciba-Geigy عرضه شد و اکنون در سطح جهانی به عنوان یک داروی عمومی تولید می‌شود. این دارو با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ تولید پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان را کاهش می‌دهد و به این روش اثر ضددرد و ضدالتهاب خود را نشان می‌دهد.[۱۹و۲۰] از دگزامتازون و دیکلوفناک برای کاهش درد ناشی از سرطان نیز استفاده می‌شود. همچنین این داروها در غلظت کم می‌توانند التهاب را کاهش دهند تا جلوی پیشروی سرطان گرفته شود. یکی از دلایل ایجاد سرطان افزایش التهاب در درون سلول‌ها است. بنابراین می‌توان از این داروهای کاهنده التهاب برای بررسی اثر سرکوب التهاب در کاهش پیشرفت سرطان استفاده نمود. این مطالعه به منظور تعیین اثر هم‌افزایی داروهای دگزامتازون و دیکلوفناک بر روی حیات سلول‌های سرطانی رده K562 انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی در آزمایشگاه کشت سلول گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه طی پاییز ۱۳۹۷ لغایت تابستان ۱۳۹۸ انجام شد. مطالعه مورد تایید (شماره ۴۳۰/پد/۲ مورخ ۱۳۹۷/۳/۲۲) معاونت پژوهشی دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه قرار گرفت.

سلول‌های سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهران خریداری و سپس در محیط کشت سلول RPMI 1640 (Gibco- انگلستان) دارای سرم جنین گاوی ۱۰ درصد (Fetal Bovin Serum: FBS) (Gibco- انگلستان)و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و پنی‌سیلین (Gibco – انگلستان) با مقدار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت داده شدند. شرایط لازم برای کشت سلول‌های K562 دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در انکوباتور بود.[۲۱]

تهیه غلظت‌های مختلف از دیکلوفناک و دگزامتازون و ترکیب آنها: غلظت‌های مختلف از داروهای دیکلوفناک و دگزامتازون (شرکت سیگما (Sigma، آمریکا)، در حلال DMSO (Dimethyl sulfoxide) و آب به عنوان حلال تهیه شدند. غلظت‌های ۲ ، ۴ ، ۶ و ۸ میکرومول بر میلی‌لیتر برای دگزامتازون و غلظت‌های ۲۰ ، ۴۰ ، ۶۰ و ۸۰ میکرومول بر میلی‌لیتر برای دیکلوفناک تهیه شدند. ساخت غلظت‌های مختلف داروی ترکیبی براساس غلظت IC50 (Half Maximal Inhibitory Concentration) داروی مذکور انجام گرفت.

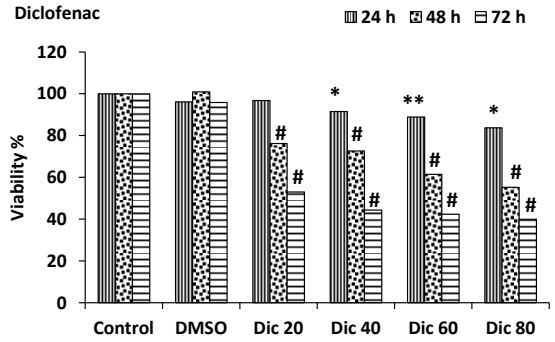
بررسی اثر سمیت سلولی با آزمون MTT (Multi-Target Tracking): در این روش به منظور بررسی اثرات ضدتوموری دیکلوفناک و دگزامتازون و داروی ترکیبی آنها، ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به همراه محیط کشت حاوی غلظت‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میکرومول بر میلی‌لیتر از دگزامتازون، غلظت‌های ۲۰ ، ۴۰ ، ۶۰ و ۸۰ میکرومول بر میلی‌لیتر از دیکلوفناک و غلظت‌های ۲۰ ، ۴۰ ، ۶۰ و ۸۰ میکرومول بر میلی‌لیتر برای ترکیب این داروها (داروی ترکیبی) به هر چاهک اضافه شد.

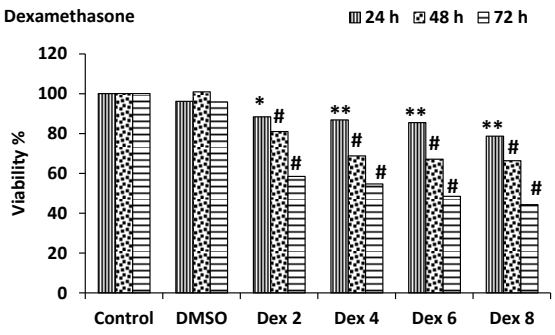
پس از ۷۲ ساعت مقدار ۱۰ میکرو لیتر از محلول MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] با غلظت 5mg/ml در هر کدام از چاهک‌ها ریخته شد و چند ثانیه به آرامی پلیت همزده شد. پس از گذشت ۳ ساعت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO درون چاهک‌ها ریخته شد. پس از ۱۵ دقیقه تکان دادن آرام پلیت‌ها بر روی دستگاه شیکر با دور پایین، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.[۲۲] براساس جذب هر چاهک نسبت به چاهک کنترل، میزان زنده‌مانی (Viability) نمونه‌های تیمارشده بدست آمد.

محاسبه IC50 داروها توسط نرم‌افزار CompuSyn: نرم‌افزار Compusyn توسط دو دانشمند Chou و Talalay در مورد بررسی اثر هم‌افزایی (سینرژیسم) دارو طرح ریزی شده است. برای محاسبه IC50 داروی دگزامتازون و دیکلوفناک و همچنین بررسی سینرژیسم بین داروها با استفاده از نتایج به دست آمده از تست MTT از این نرم افزار استفاده شد.[۲۳] اگر میزان شاخص ترکیبی (Combition Index: CI) کمتر از یک باشد؛ نشان‌دهنده سینرژیسم بین دو دارو هست.

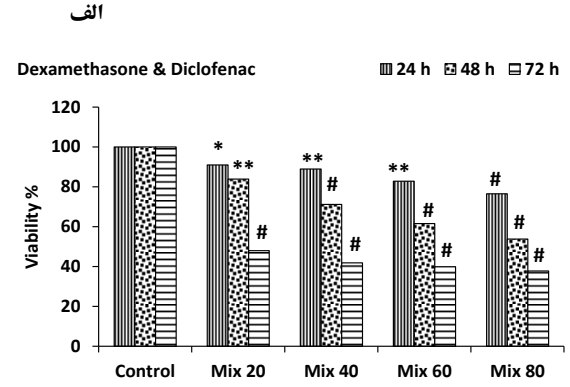
بررسی آپوپتوز با استفاده از تکنیک الکتروفورز DNA : سلول‌ها در چهار فلاسک T۲۵ هر کدام حاوی یک میلیون سلول کشت داده شدند. فلاسک اول برای کنترل و فلاسک‌های بعدی به ترتیب با غلظت IC50 از داروی دگزامتازون و دیکلوفناک و داروی ترکیبی با غلظت ۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر تیمار شده و به مدت زمان ۷۲ ساعت در انکوباتور، انکوبه شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول‌ها سانتریفوژ در دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و با استفاده از کیت استخراج DNA به نام DNPTMKit (شرکت سیناکلون) DNA آنها استخراج شد. بدین صورت که روی رسوب سلولی بافر پروتئاز و سپس ۵ میکرولیتر از محلول پروتئاز اضافه شده و ورتکس شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاصل با ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز مخلوط گردید و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. در مرحله بعد با محلول رسوب‌دهنده به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط شد و پس از ورتکس به مدت ۵ ثانیه و به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۲۰۰۰سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد یک میلی‌لیتر از محلول شستشو روی رسوب سلولی اضافه شد و پس از ۵ ثانیه ورتکس به مدت ۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و مایع رویی با سمپلر دور ریخته شد و رسوب ایجاد شده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد تا به طورکامل خشک شود. بعد از خشک شدن بر روی آن ۵۰ میکرولیتر بافر حل‌کننده ریخته شد و به آرامی تکان داده شد. سپس در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و بعد از آن به مدت ۳۰ ثانیه در g۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی حاوی DNA خالص بود که به وسیله آگارز یک درصد مورد الکتروفورز قرار گرفت.[۲۴]

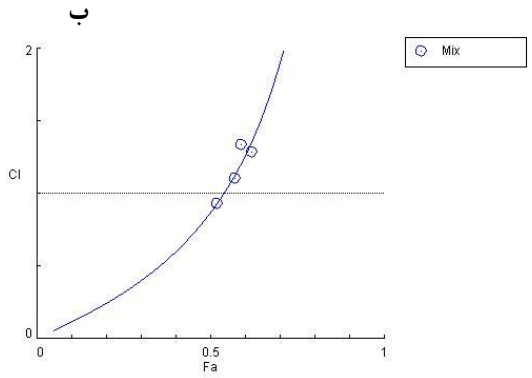
بررسی مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت و بررسی آپوپتوز از طریق رنگ‌آمیزی هوخست (Hoechst 33342): در این روش در چهار چاهک یک پلیت ۲۴ خانه‌ای ۲×۱۰^{۵} سلول در یک میلی‌لیتر محلول محیط کشت با ۱۰FBS درصد کشت داده شدند. سپس دگزامتازون و دیکلوفناک با غلظتIC50 و داروی ترکیبی با غلظت ۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها افزوده شدند. برای مشاهده مورفولوژی سلول‌ها از چاهک‌ها در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با استفاده از میکروسکوب اینورت (Zeiss ، آلمان) عکسبرداری شد. سپس بعد از ۷۲ ساعت محتویات هر چاهک به میکروتیوب انتقال یافت و در دور rpm ۲۰۰۰ مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محتویات رویی دور ریخته شد و روی رسوب سلولی، ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول برای تثبیت کردن سلول‌ها اضافه گردید و ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس دوباره سانتریفوژ گردید و محلول رویی دور ریخته شد و بر روی رسوب سلولی ۵۰ میکرولیتر بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) و یک میکرولیتر رنگ هوخست ۳۳۳۴۲ (خریداری شده از سیگما) رقیق‌شده اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. بار دیگر سانتریفیوژ شده و روی رسوب ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS افزوده گردید و کاملاً بهم زده شد تا محتویات یکنواختی به دست آمد. یک قطره از نمونه‌های به‌دست آمده روی لام قرار داده شد. لام‌های تهیه شده با میکروسکوپ فلوئورسانس مورد بررسی و عکسبرداری قرار گرفتند. برای مطالعه آپوپتوز به وسیله





نمودار۱ : میانگین اثر غلظت‌های مختلف داروی دیکلوفناک و دگزامتازون (میکرومول بر میلی لیتر) بر روی سلول‌های رده K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار
* P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱، # P<۰/۰۰۱





نمودار۲ : الف) اثر غلظت‌های مختلف داروی ترکیبی دیکلوفناک و دگزامتازون (میکرومول بر میلی لیتر) بر روی سلول‌های رده K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار (* P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱، # P<۰/۰۰۱). ب) شاخص هم‌افزایی غلظت ترکیبی توسط نرم افزار Compusyn بر اساس میزان OD سوسپانسیون‌های سلولی تیمار شده با غلظت‌های مختلف داروی ترکیبی

میکروسکوپ فلورسنت، در رنگ‌آمیزی با تست هوخست هسته سلول‌های طبیعی به صورت یکنواخت وگرد دیده می‌شوند. درصورتی که هسته سلول‌های آپوپتوز شده به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه‌شدن هسته، به صورت نقاط درخشان، متراکم و قطعه‌قطعه‌شده قابل مشاهده است.[۲۵]

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی ارتباط غلظت داروی تیمار شده و زمان تیمار در مقایسه با نمونه کنترل از T-Test در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد. مقادیر ارایه شده نمودارها در نرم افزار Excel رسم شد و در نمودارها به صورت میانگین سه تکرار مستقل±انحراف استاندارد است.

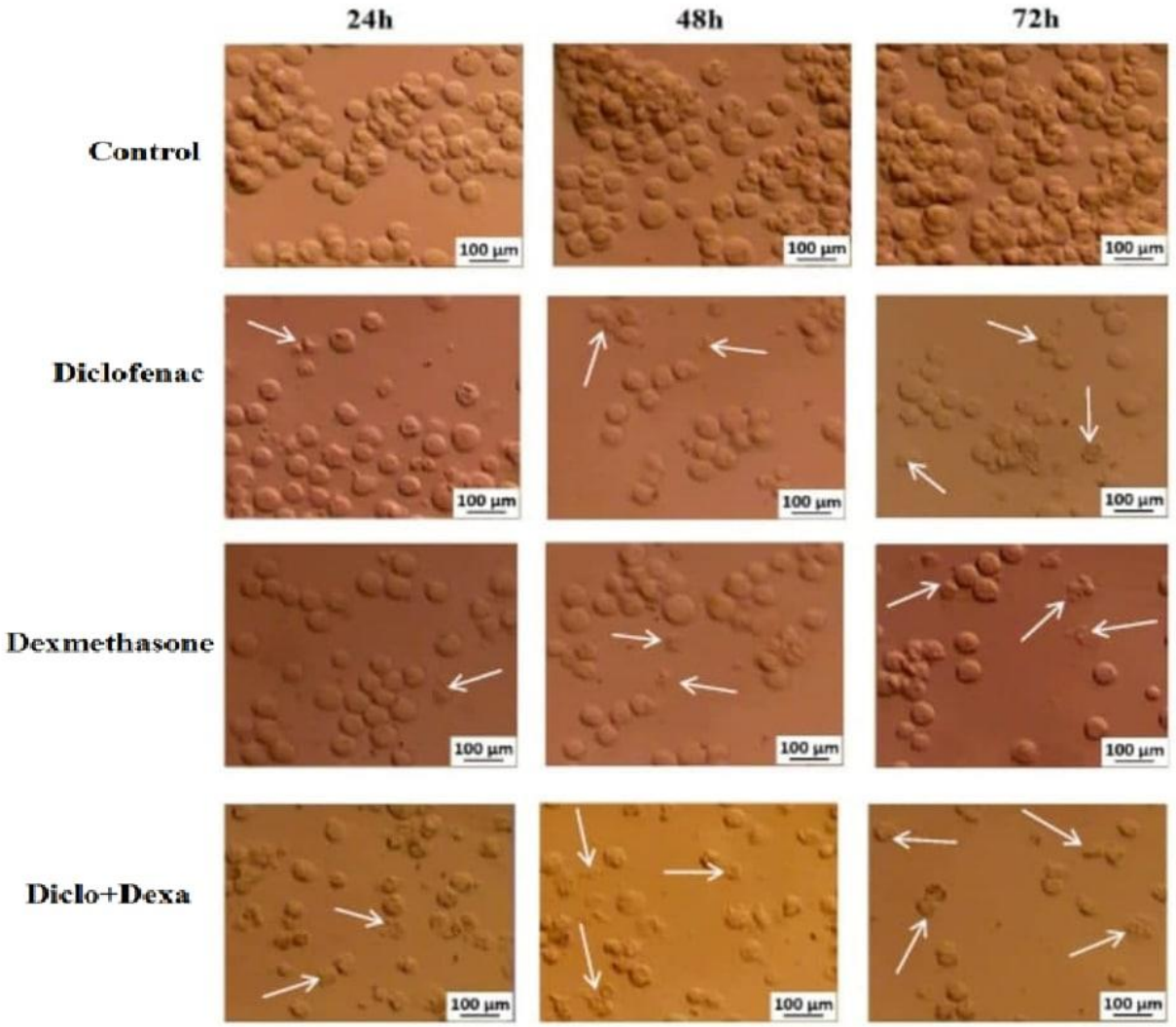
یافته‌ها

با توجه به نتایج این مطالعه، داروهای دیکلوفناک، دگزامتازون و داروی ترکیبی زیستایی سلول‌های K562 را کاهش دادند.

نمونه‌های تیمارشده با دیکلوفناک در مقایسه با گروه کنترل که هیچ دوزی از دارو را دریافت نکردند؛ دارای فعالیت مرگ‌ومیر سلولی بودند. با افزایش غلظت دیکلوفناک، میزان سمیت سلولی (سیتوتوکسیسیتی) افزایش یافت و فعالیت مرگ و میر سلولی با دوز دارو ارتباط خطی داشت. این حالت در تمامی زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد. فعالیت سیتوتوکسیسیتی وابسته به زمان بود و با آن نیز رابطه خطی داشت. بیشترین اثر در ۷۲ ساعت و غلظت ۸۰ میکرومولار مشاهده شد که میزان سیتوتوکسیسیتی آن ۶۰درصد بود (P<۰/۰۰۱). دیکلوفناک در تمامی غلظت‌ها موجب کاهش حیات سلولی گردید. غلظت IC50 داروی دیکلوفناک برابر ۲۹/۴۰ میکرومول بر میلی‌لیتر تعیین شد (نمودار یک).

نمونه‌های تیمار شده با دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل دارای کاهش زیستایی بودند. (نمودار یک). با افزایش غلظت دگزامتازون، میزان سمیت سلولی (سیتوتوکسیسیتی) افزایش یافت و فعالیت مرگ و میر سلولی با دوز دارو ارتباط خطی داشت. این حالت در تمامی زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد. فعالیت سیتوتوکسیسیتی وابسته به زمان بود و با آن نیز رابطه خطی داشت. بیشترین اثر در ۷۲ ساعت و غلظت ۸ میکرومولار مشاهده شد که میزان سیتوتوکسیسیتی آن ۵۵درصد بود (P<۰/۰۰۱). دگزامتازون در تمامی غلظت‌ها موجب کاهش حیات سلولی گردید. غلظت IC50 داروی دگزامتازون برابر ۵/۲۷ میکرومول بر میلی‌لیتر تعیین شد.

نمودار ۲ بیانگر آن است که نمونه‌های تیمار شده با داروی ترکیبی در مقایسه با گروه کنترل دارای فعالیت مرگ و میر سلولی بوده و

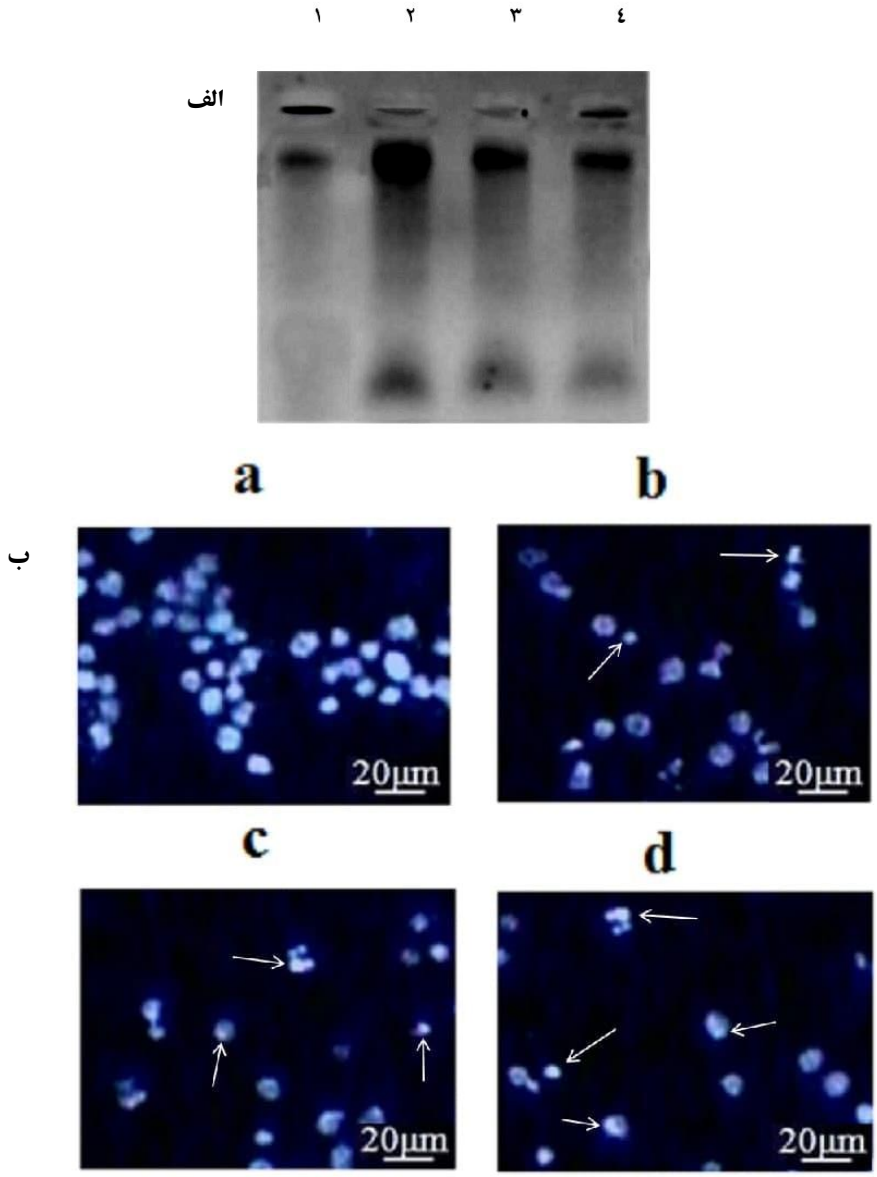


شکل ۱ : نمای میکروسکوپ فازکنتراست (اینورت) از سلول‌های K562 تیمارشده با داروهای دیکلوفناک، دگزامتازون و داروی ترکیبی دیکلوفناک و دگزامتازون در زمان‌های متفاوت (بزرگنمایی 40X). پیکان‌ها نشان‌دهنده سلول‌های آپوپتوتیک هستند.

سبب کاهش بقای سلولی شدند. با افزایش غلظت داروی ترکیبی، میزان سمیت سلولی افزایش یافت و فعالیت مرگ و میر سلولی با دوز دارو ارتباط خطی داشت. این حالت در تمامی زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد. فعالیت سیتوتوکسیسیتی وابسته به زمان بود و با آن نیز رابطه خطی داشت. بیشترین اثر در ۷۲ ساعت و غلظت ۸۰ میکرومولار مشاهده شد که میزان سیتوتوکسیسیتی آن ۶۲درصد بود. داروی ترکیبی در تمامی غلظت‌ها موجب کاهش حیات سلولی گردید (P<۰/۰۰۱). میزان غلظت IC50 داروی ترکیبی برابر با ۱۵/۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

داروی ترکیبی در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومول بر میلی‌لیتر بررسی شد. با توجه به نمودار ۲ تنها در پایین‌ترین غلظت یعنی ۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر اثر هم‌افزایی درکاهش حیات سلول‌های سرطانی K562 نشان دادند. چون تنها در غلظت ۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر هم‌افزایی مشاهده شد؛ بنابراین در ادامه مراحل از این غلظت داروی ترکیبی استفاده شد.

شکل ظاهری سلول‌های K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت تیمار توسط غلظت‌های مختلف داروهای دیکلوفناک، دگزامتازون و نیز داروی ترکیبی به‌وسیله میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی 40X مشاهده گردید (شکل یک). سلول‌های تیمار شده با داروها دچار کاهش تعداد سلولی شده و سلول‌های با مورفولوژی آپوپتوتیک بیشتر شده بودند. در ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌های آپوپتوتیک بیشتر از زمان‌های دیگر بودند (شکل یک). با توجه به مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با داروی ترکیبی به مدت ۷۲ ساعت و مقایسه آن با داروهای دیکلوفناک و دگزامتازون، تعداد سلول‌ها کاهش بیشتری را نشان دادند. این در حالی است که سلول‌های با مورفولوژی آپوپتوتیک افزایش بیشتری یافتند. داروی ترکیبی موثرتر از داروهای



شکل ۲ : الف) بررسی آپوپتوز سلول‌های K562 بعد از ۷۲ تیمار بر روی ژل الکتروفورز. ۱) DNA سلول‌های بدون تیمار بر روی ژل الکتروفورز؛ ۲) DNA سلول‌های تحت تیمار با غلظت هم‌افزایی از دیکلوفناک و دگزامتازون؛ ۳) DNA سلول‌های تحت تیمار با غلظت IC50 دیکلوفناک؛ ۴) DNA سلول‌های تحت تیمار با غلظت IC50 دگزامتازون.
ب) سلول‌های K562 رنگ‌آمیزی شده با Hoechst زیر میکروسکوپ فلورسانس (پیکان‌ها نشان‌دهنده سلول‌های آپوپتوتیک هستند.) a) سلول‌های بدون تیمار (کنترل)؛ b) سلول‌های تیمار با غلظت IC50 دیکلوفناک؛ c) سلول‌های تیمار با غلظت IC50 دگزامتازون؛ d) سلول‌های تیمار با غلظت هم‌افزایی حاصل از ترکیب دیکلوفناک و دگزامتازون.

منفرد باعث کاهش تعداد سلول‌های سرطانی و افزایش سلول‌های آپوپتوتیک گردید.

رنگ‌آمیزی با هوخست و الکتروفورز DNA وقوع آپوپتوز را تایید کردند (شکل ۲-الف). در نمونه کنترل (چاهک ۱) شکستگی DNA ناچیز بود؛ ولی در نمونه تیمار شده با داروی ترکیبی شکستگی DNA و اسمیر بیشتر از بقیه بود. به طوری که بیشترین شکستگی و اسمیر DNA در این چاهک مشاهده شد و مرگ سلولی بیشتر در این نمونه بود. داروی ترکیبی خصلت القاءکننده مرگ سلولی را بیشتر از داروهای دگزامتازون (چاهک ۳) و دیکلوفناک (چاهک ۴) داشت. هسته‌های متراکم (نقاط پرنور) و هسته‌های قطعه‌قطعه شده در شکل نشان‌دهنده هسته سلول‌های در حال آپوپتوز هستند. شکل ۲-ب نشان‌دهنده آپوپتوز سلول‌های تیمارشده با دیکلوفناک، دگزامتازون و داروی ترکیبی است. میزان آپوپتوز با ترکیب داروها بیشتر از داروهای مذکور به تنهایی بود. در داروی ترکیبی تعداد هسته‌های آپوپتوتیک بیشتر و تعداد هسته‌های سالم کمتر از سلول‌های تیمارشده با دگزامتازون و دیکلوفناک و قدرت داروی ترکیبی در القاء آپوپتوز بیشتر از دو داروی دیگر بود. در سلول‌های کنترل هسته سلول‌ها گرد و یکدست بودند که نشان‌دهنده سالم بودن سلول‌ها بود.

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، ترکیب داروی دیکلوفناک و دگزامتازون با غلظت ۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر به صورت موثری

باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده K562 نسبت به داروهای منفرد شد.

امروزه روش‌های مختلفی برای درمان سرطان خون وجود دارد.[۷] استفاده از مهارگرهای تیروزین‌کیناز BCR/ABL یکی از روش‌های درمان است و همچنین از مهارگرهای پروتئین ضدآپوپتوزی BCL-2 مانند venetoclax استفاده می‌شود.[۲۶] همچنین مطالعات نشان داده است که پروتئین آداپتور مبدل سیگنال۱ (STAP-1) (signal-transducing adaptor protein 1) در سلول‌های بنیادی CML تنظیم می‌شود و با تنظیم ژن‌های ضدآپوپتوز پایین دست STAT5 (signal-transducing adaptor protein 5)، آپوپتوز سلول‌های بنیادی لوسمی میلوئید مزمن را کاهش می‌دهد؛[۶] ولی با این وجود استفاده از روش‌های دیگر ضروری به نظر می‌رسد. یکی از این روش‌ها کاربرد داروهای ضدالتهاب است. مطالعات نشان داده‌اند که نزدیک ۲۰درصد این مرگ‌ومیرها با التهاب و عفونت مزمن در مسیر تومورزایی همراه است. خانواده دارویی گلوکوکورتیکوئیدها (GC) خصلت ضدالتهاب دارند.[۲۷] گیرنده گلوکوکورتیکوئید دو ایزوفرم گوناگون (آلفا و بتا) دارد. به نظر می‌رسد ارتباط نزدیکی بین انواع ایزوفرم‌های آلفا و آپوپتوز القایی توسط گلوکوکورتیکوئید وجود دارد. به عبارت دیگر تاثیر گلوکوکورتیکوئید بر سلول، وابسته به ایزوفرمی از گیرنده بوده که در سلول بیان شده است.[۲۸] مطالعات نشان داده‌اند که نبودن پروتئین‌های Bak و Bax باعث مقاومت در برابر آپوپتوز القایی توسط گلوکوکورتیکوئیدها می‌شود. بنابراین بودن این دو پروتئین در آپوپتوز القایی داروهای گلوکوکورتیکوئید الزامی است و این نیز به معنی ارتباط معنی‌دار این دو پروتئین با روش کار داروهای مذکور است.[۲۷و۲۹و۳۰] گلوکوکورتیکوئیدها پاسخ التهابی را توسط چندین مکانیسم مهار می‌کنند. یکی از مکانیسم‌های آنها مهار فاکتور رونویسی NF-κB است. این فاکتور به عنوان تنظیم‌کننده مهم ایمنی میزبان و پاسخ التهابی به کار می‌رود. علاوه براین، NF-κB در حفاظت از سلول‌ها از آپوپتوز در پاسخ به آسیب DNA یا درمان سیتوکین دخیل است. تحریک مسیر NF-κB به‌وسیله آبشارهای مختلف انتقال سیگنال می‌تواند باعث افزایش بیان آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) شود که این آنزیم با تولید پروستاگلندین‌ها باعث بروز التهاب می‌شود.[۲۹] در این تحقیق داروهای دگزامتازون و دیکلوفناک (مهارگر سیکلواکسیژناز-۲) و نیز داروی ترکیبی باعث کاهش حیات سلولی شدند. داروهای مذکور باعث کاهش حیات سلولی شدند که وابسته به زمان و وابسته به غلظت بودند. مکانیسم داروهای گلوکورتیکوئیدی می‌تواند به صورت پیوستن داروی گلوکورتیکوئیدی به گیرنده‌اش و همودایمرشدن آنها و تشکیل کمپلکس باشد که این کمپلکس وارد هسته شده و باعث مهار فعالیت عوامل رونویسی مانند AP-1 و NF-κB شود. در هر دو حالت مهار تولید سیتوکاین‌ها، توقف چرخه سلولی و در پایان القای آپوپتوز رخ خواهد داد.[۳۱] احتمالاً داروی دگزامتازون با مهار فاکتور NF-κB باعث می‌شود که حیات سلول‌های K562 کاهش پیدا کند. مطالعات نشان داده‌اند که در سرطان پروستات مقاوم به اختگی (castration-resistant prostate cancer) هر دو داروی دگزامتازون و پردنیزولون موثر بودند؛ اما در این سرطان دگزامتازون فعال بود و برتری داشت.[۳۲] مطالعات همچنین نشان داده‌اند که دگزامتازون می‌تواند سبب مهار رشد در رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی و همچنین به القاء آپوپتوز از طریق مسیر داخلی منجر شود. در حالی که تاثیری روی القاء آپوپتوز از طریق مسیر خارجی ندارد. در واقع تیمار رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی با غلظت معینی از دگزامتازون می‌تواند بیان ژن‌های دخیل در مسیر داخلی آپوپتوز را در راستای مرگ برنامه‌ریزی سلول تغییر دهد.[۳۳] احتمالاً دگزامتازون با کاهش بیان Gal-3 باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های زایای اسپرم موش می‌شود.[۳۴] در مطالعه‌ای دگزامتازون باعث افزایش معنی‌دار در بیان پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax در سلول‌های زایای اسپرم موش سوری شد و مراحل وابسته به هورمون چرخه اسپرماتوژنز بیشترین حساسیت را نشان داد.[۳۵] بررسی‌ها نشان می‌دهند که دیکلوفناک می‌تواند بر روی سلول‌های سرطانی اثرگذار باشد[۳۶] و همچنین مطالعات قبلی نشان می‌دهند که داروهای ضدالتهابی می‌توانند بر سرکوب تکثیر و القاء مرگ سلولی از طریق تغییر در چرخه سلولی و عوامل پیش‌مرگ سلولی در استئوبلاست انسان نقش داشته باشند.[۳۷] مکانیسم‌های متعددی برای توصیف اثر ضدسرطانی دیکلوفناک بیان شده است. تحقیقات نشان داد دیکلوفناک دارای اثرات توکسیک بر رده سلولی سرطانی HeLa است. اگرچه این اثرگذاری با توجه به دوز مورد استفاده متفاوت است.[۳۸] در مطالعه حاضر داروی دیکلوفناک باعث کاهش حیات در سلول‌های K562 شد که این کاهش حیات از طریق القاء آپوپتوز در این سلول‌ها اتفاق افتاد. ولی استفاده از دوزهای بالای دیکلوفناک می‌تواند سبب ازبین‌رفتن سلول‌های نرمال کلیوی شده و استفاده از دوزهای بالای آن مناسب نیست.[۳۹] داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی مهارکننده سیکلواکسیژناز۲ مانند سلکسیب توانایی ایجادکاهش حیات سلولی و آپوپتوز در انواع مختلف سلول‌های سرطانی را نشان داده‌اند.[۳۸] اهمیت ویژه در این میان مهار سنتز PGE2 است. PGE2 از تبدیل اسیدآراشیدونیک به پروستاگلاندین H2 به وسیله COX- 1 و COX- 2 و پس از آن با پردازش بیشتر با میکروزومال پروستاگلاندین سنتاز ۱ (mPGES-1) ادامه پیدا می‌کند. سطوح بالایی از mPGES-1 و PGE2 در انواع مختلف سرطان یافت

می‌شوند و با التهاب مزمن همراه است که با پروتومورها مرتبطند.[۳۶] دیکلوفناک مانند سایر مهارکننده‌های آنزیم‌های COX نیز از طریق کاهش سنتز PGE2 عمل می‌کند و بنابراین بسیاری از اثرات ضدسرطان دیکلوفناک به‌طورمستقیم یا غیرمستقیم باکاهش سطح PGE2 مرتبط است. با این حال، اختلاف قابل توجهی در انتخاب COX- 2 یا COX- 1 بین داروهای غیراستروئیدی ضدالتهابی مختلف وجود دارد و برخی از شواهد نشان می‌دهد که دیکلوفناک با استفاده از مکانیسم‌های متفاوت نسب به سایرداروهای مورد استفاده به COX- 2 متصل می‌شود و می‌تواند تاثیر بیشتری نسبت به سایر داروهای در دسترس داشته باشد.[۴۰] بنابراین می‌توان گفت که در مطالعه حاضر شاید داروی دیکلوفناک از طریق مهار COX-2 باعث ایجاد آپوپتوز شده است. برای اولین بار در این تحقیق ما از داروی ترکیبی دگزامتازون و دیکلوفناک استفاده کردیم. نتایج حاصل از اثر داروی ترکیبی جالب بود. زیرا بیشتر از داروهای منفرد باعث کاهش حیات سلول‌های سرطانی K562 شد که این اثر آن از طریق القاء بیشترآپوپتوز نسبت به داروهای منفرد بود. با توجه به نتایج حاصل از داروی ترکیبی می‌توان گفت که این دارو قدرت بیشتری در کاهش حیات سلول‌های سرطانی K562 دارد. در داروی ترکیبی در غلظت ۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر خصلت هم‌افزایی بین دو داروی دگزامتازون و دیکلوفناک مشاهده شد که از این بابت مهم است که کمترین غلظت در بین غلظت‌های به‌کاربرده شده از این دارو است. استفاده از داروی ترکیبی برای مطالعات بیشتر در زمینه درمان سرطان میلوئیدی مزمن در مراحل in vivo پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که داروهای دگزامتازون، دیکلوفناک و داروی ترکیبی در in vitro باعث کاهش حیات سلولی و القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 شدند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای حسن طه‌زاده برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی (شماره ۱۴۹۱) از دانشکده علوم دانشگاه ارومیه بود. بدین‌وسیله از زحمات استادان و مسؤولین گرامی گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه و معاونت پژوهشی دانشگاه که با کمک و پشتیبانی خویش ما را در این مطالعه یاری کردند؛ صمیمانه تشکر می‌نماییم. نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچگونه تضاد منافعی ندارند.

References

1. El Sharkawi FZ, El Shemy HA, Khaled H. Anticancer activity of some commercial antihypertensive drugs by Neutral Red assay. Life Sci J. 2013; 10(1): 609-13. DOI: 10.7537/marslsj100113.98

2. Vaezi SM, Mohammadzadeh M, Pazhang Y. [Anti-Proliferative and Apoptotic Effect of Prednisolone on K562 Cell Line (Chronic Myeloid Leukemia)]. J Guil Uni Med Sci. 2017; 25(100): 38-46. [Article in Persian]

3. Kwan JM, Fialho AM, Kundu M, Thomas J, Hong CS, Das Gupta TK, et al. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. Leuk Res. 2009 Oct; 33(10): 1392-99. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.01.024

4. Burger JA. Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 2020 Jul; 383(5): 460-73. DOI: 10.1056/NEJMra1908213

5. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000 Nov; 96(10): 3343-56.

6. Ishiura M, Kitai Y, Kashiwakura JI, Muromoto R, Toda J, Ichii M, et al. Positive interactions between STAP-1 and BCR-ABL influence chronic myeloid leukemia cell proliferation and survival. Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jun; 556: 185-91. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.03.162

7. Liu J, Zhang Y, Huang H, Lei X, Tang G, Cao X, Peng J. Recent advances in Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors for overriding T315I mutation. Chem Biol Drug Des. 2021 Mar; 97(3): 649-64. DOI: 10.1111/cbdd.13801

8. Ozkan T, Hekmatshoar Y, Pamuk H, Ozcan M, Yaman G, Yagiz GC, et al. Cytotoxic effect of 6-Shogaol in Imatinib sensitive and resistant K562 cells. Mol Biol Rep. 2021 Feb; 48(2): 1625-31. DOI: 10.1007/s11033-021-06141-2

9. Anusha, Dalal H, Subramanian S, Snijesh VP, Gowda DA, Krishnamurthy H, et al. Exovesicular-Shh confers Imatinib resistance by upregulating Bcl2 expression in chronic myeloid leukemia with variant chromosomes. Cell Death Dis. 2021 Mar; 12(3): 259. DOI: 10.1038/s41419-021-03542-w

10. O'Dwyer M. Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. Oncologist. 2002; 7 (Suppl 1): 30-8. DOI: 10.1634/theoncologist.7-suppl_1-30

11. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksma OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. Blood. 1996 Nov; 88(9): 3522-7.

12. Han SI, Kim YS, Kim TH. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. BMB Rep. 2008 Jan; 41(1): 1-10. DOI: 10.5483/bmbrep.2008.41.1.001

13. Meng XW, Lee SH, Kaufmann SH. Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? Curr Opin Cell Biol. 2006 Dec; 18(6): 668-76. DOI: 10.1016/j.ceb.2006.10.008

14. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res. 2011 Sep; 30(1): 87. DOI: 10.1186/1756-9966-30-87

15. Rutz HP, Herr I. Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. Cancer Biol Ther. 2004 Aug; 3(8): 715-18. DOI: 10.4161/cbt.3.8.966

16. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011 Nov; 96(1-4): 27-36. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2011.08.004

17. Garg V, Jusko WJ. Bioavailability and reversible metabolism of prednisone and prednisolone in man. Biopharm Drug Dispos. 1994 Mar; 15(2): 163-72. DOI: 10.1002/bdd.2510150208

18. Bunz F. Principles of cancer genetics. 1st ed. New York: Springer. 2008; pp: 203-70.

19. Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. Curr Med Res Opin. 2010 Jul; 26(7): 1715-31. DOI: 10.1185/03007995.2010.486301

20. Tonussi CR, Ferreira SH. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. Eur J Pharmacol. 1994 Jan; 251(2-3): 173-79. DOI: 10.1016/0014-2999(94)90398-0

21. Xu MH, Zhang GY. Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines. World J Gastroenterol. 2005 Mar; 11(11): 1693-96. DOI: 10.3748/wjg.v11.i11.1693

22. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol. 2011; 731: 237-45. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5_20

23. Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. Methods Mol Biol. 2011; 731: 421-34. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5_34

24. Singh NP. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. Exp Cell Res. 2000 Apr; 256(1): 328-37. DOI: 10.1006/excr.2000.4810

25. Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ. Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Mar; 8(2): 460-64. DOI: 10.1128/CDLI.8.2.460-464.2001

26. Massimino M, Tirrò E, Stella S, Pennisi MS, Vitale SR, Puma A, et al. Targeting BCL-2 as a Therapeutic Strategy for Primary p210BCR-ABL1-positive B-ALL Cells. In Vivo. 2020 Mar-Apr; 34(2): 511-16. DOI: 10.21873/invivo.11802

27. Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. Br J Pharmacol. 2006 Jan; 147(Suppl 1): S258-68. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706456

28. Gruver-Yates AL, Cidlowski JA. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. Cells. 2013 Mar; 2(2): 202-23. DOI: 10.3390/cells2020202

29. Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. Clin Cancer Res. 2002 Jun; 8(6): 1681-94.

30. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. Nat Immunol. 2002 Oct; 3(10): 932-39. DOI: 10.1038/ni834

31. Inaba H, Pui CH. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. Lancet Oncol. 2010 Nov; 11(11): 1096-106. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70114-5

32. Venkitaraman R, Lorente D, Murthy V, Thomas K, Parker L, Ahiabor R, et al. A randomised phase 2 trial of dexamethasone versus prednisolone in castration-resistant prostate cancer. Eur Urol. 2015 Apr; 67(4): 673-79. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.10.004

33. Hajimirza Shafiesoltani P, Forouzesh F, Shabani M. [Effect of Dexamethasone on Fas/FasL and Bax/Bcl2 mRNA Expression in Human Colorectal Cancer HT-29 Cell Line]. Research in Medicine. 2020; 44(2): 352-59. [Article in Persian]

34. Khorsandi L, Orazizadeh M. [The effects of Dexamethasone on Galectin-3 expression in the mouse testicular tissue]. Yafte. 2013; 14(5): 63-72. [Article in Persian]

35. Mahmoud H, Mahmoud O, Layasadat K, Naeim A. Dexamethasone effects on Bax expression in the mouse testicular germ cells. Folia Histochem Cytobiol. 2009; 47(2): 237-41. DOI: 10.2478/v10042-009-0041-z

36. Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-diclofenac as an anti-cancer agent. Ecancermedicalscience. 2016 Jan; 10: 610. DOI: 10.3332/ecancer.2016.610

37. Valle BL, D'Souza T, Becker KG, Wood WH 3rd, Zhang Y, Wersto RP, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells. PLoS One. 2013 Apr; 8(4): e61836. DOI: 10.1371/journal.pone.0061836

38. Erfani M, Ghorbani M, Ahmadi R. [The Effect of Diclofenac on Caspase-8 and Caspase-9 Activity in Cervical Cancer Cells (HeLa) in Cell Culture]. Qom Univ Med Sci J. 2018; 12(6): 1-9. DOI: 10.29252/qums.12.6.1 [Article in Persian]

39. Ahmadi R, Sagharjoghi Farahani M, Azadkhah R. [The Effects of Diclofenac and Ibuprofen on HEK Cells in Cell Culture]. Yafte. 2017; 19(4): 68-75. [Article in Persian]

40. Nargesi S, Koordbacheh P, Farahyar S, Noorbakhsh F, Rezaie S. [The Effects of Diclofenac Sodium on Growth and Morphological Changes in Aspergillus Fumigatus and Exploring its Effects on Siderophore Protein by Determining the SidB Gene Expression]. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research. 2016; 14(3): 85-96. [Article in Persian]