Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Autumn 2021. Vol 30. Num 3

Research Paper

Evaluation of Radiosensitive Effect of Tolmetin in Radiotherapy on Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29

Saeede Rahmatpour[1], Hamid Saeidi Saedi[2], *Mona Haddad Zahmatkesh[3]

1. Student Research Committee, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
2. Department of Radiology, GI Cancer Screening and Prevention Research Center, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
3. Department of Pharmaceutical Biotechnology-Nuclear Pharmacy, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Rahmatpour S, Saeidi Saedi H, Haddad Zahmatkesh M. Evaluation of Radiosensitive Effect of Tolmetin in Radiotherapy on Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2021; 30(3):204-217. https://doi.org/10.32598/JGUMS.30.3.1098.1

https://doi.org/10.32598/JGUMS.30.3.1098.1

CC BY NC

Received: 25 Jul 2021
Accepted: 25 Sep 2021
Available Online: 01 Oct 2021

Keywords:
Radiosensitive, Tolmetin, Micronucleus, Human colon cancer HT-29

ABSTRACT

Background Radiotherapy is one of the cancer treatment methods. Although radioresistance and normal tissue toxicity limit the radiation therapy in certain anatomical locations, using some substances can be useful to increase radiosensitivity on cancer cells without cytotoxicity effect on normal cells.

Objective This study aimed to evaluate the radiosensitizing effect of tolmetin in radiotherapy treatment on human colon cancer cell line HT-29.

Methods In this study, human colon cancer cells HT-29 in different groups were irradiated with 4 Gy x-ray, and tolmetin was administered in different concentrations (75, 100, and 150 µM). Then, the groups were compared with each other and with the control group by Micronucleus Assay (MN) and Nuclear Division Index (NDI). NDI investigated the cytotoxicity, and MN indicated the genotoxicity.

Results In the group receiving radiation, micronuclei increased significantly compared to the control group. In the group receiving tolmetin with a concentration of 75 and 100 µM, the number of micronuclei also increased compared to the control group. In all groups treated with tolmetin that also received radiation, a significant increase in micronuclei was observed, which was more noticeable at concentrations of 100 and 150 µM. At the same time, tolmetin at the studied concentrations did not change the NDI index.

Conclusion The present study demonstrates that tolmetin has a radiosensitizing effect on HT-29 colon cancer cells, which depends on the tolmetin concentration. In addition, tolmetin has no cytotoxic effect on this cell line.

Extended Abstract

1. Introduction

Radiation therapy is one of the standard cancer therapies. It can be used alone or in combination with chemotherapy. Radiotherapy aims to kill maximum cancer cells with minimal damage to healthy tissue. Radiation resistance and the inherent flaws of the therapeutic system create a balance between its therapeutic advantages and physiological disadvantages. Multiple approaches have been used to enhance its efficacy while reducing toxicity. These approaches include (I) enhancing radiosensitization of tumor tissue, (II) reversal of radiation resistance in tumor tissue, and (III) enhancing radioresistance of the healthy tissue [1]. Clone cancer is the fourth leading cause of cancer death [2]. Ionizing radiation is known as a factor that

* *Corresponding Author:*
Mona Haddad Zahmatkesh, PhD.
Address: Department of Pharmaceutical Biotechnology-Nuclear Pharmacy, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
Tel: +98 (13) 33486470
E-Mail: haddad@gums.ac.ir

induces micronucleus formation in cells. Increased micronucleus formation has also been observed following many radiosensitizing compounds in cells [1]. Numerous studies show the ability of many anti-inflammatory agents, especially nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), in inhibiting tumor growth [3-5]. Tolmetin is an NSAID that inhibits the synthesis of prostaglandins. The regulatory effect of tolmetin on anticancer drugs has already been studied. Tolmetin and other NSAIDs increase the toxicity of anticancer drugs by the inhibition mechanism of ß-catenin [6, 7]. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of radiosensitization of tolmetin in radiotherapy treatment on the HT-29 colon cancer cell line.

2. Methods

Human clone cancer cell line HT-29 (ATCC HTB-38) was purchased from the National Center for Biological and Genetic Resources of Iran. Cells were cultured in RPMI (Dacell) culture medium, containing 10% fetal bovine serum (Gibco), streptomycin 200 µg/mL, and penicillin 500 U/mL (Gibco). Finally, they were kept in an incubator at 37°C, under 5% CO^2 and 95% humidity. Exponentially growing HT-29 cells were treated with tolmetin in different concentrations (75, 100, and 150 µM) for 3 h before exposure to 4 Gy x-ray with a dose of 1.96 Gy/min. Radiation therapy was done in Guilan Irradiation Center. The samples were kept in a humidified atmosphere containing 5% CO^2. After 48 h incubation, 6 µg/mL cytochalasin B (Sigma) was added, and the cells were harvested for 72 h. The cells were fixed in 3:1 (v/v) methanol/acetic acid. Afterward, the cells were dropped onto cooled slides with a Pasteur pipette and air-dried. The slides were stained in 10% Giemsa (Merck), and the MNs were scored in 500 binucleated cells. They were observed by a light microscope using a 400x magnification based on the criteria summarized by Fenech (2000).

3. Results

The measurement of micronucleated and binucleated cells and the total number of micronuclei in 500 binucleated cells showed the following results. As it is clear from the results, in non-radiation groups, a significant difference was observed between the treated groups with 75 and 100 µM tolmetin and the control group ($P<0.05$). In all treated groups with tolmetin that also received radiation, a significant increase in the number of micronuclei was observed, which was more noticeable at concentrations of 100 and 150 µM. At the same time, tolmetin at the studied concentrations did not change the NDI index. However, a significant difference was observed between the radiation group with the control group regarding the NDI index ($P<0.05$).

4. Discussion and Conclusion

Resistance of cancer cells to ionizing radiation is a challenge in the radiotherapy regimen. Cancer cells activate different signaling pathways that lead to resistance to radiation-induced cell death [8]. Therefore, the use of agents or compounds that can sensitize tumor cells to radiation and maximize the dose of radiation to the patient is important. It is desirable that these compounds have no side effects, no cytotoxicity, and be cheap and available to the public. This study aimed to evaluate the radiosensitizing effect of tolmetin in radiotherapy treatment on human colon cancer cell line HT-29. Final results demonstrated that tolmetin has a radiosensitizing effect on HT-29 colon cancer cells, which depends on the tolmetin concentration. In addition, tolmetin has no cytotoxic effect on this cell line.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of Guilan University of Medical Sciences (code: IR.GUMS.REC.1398.490). Al ethical principles were considered in this article.

Funding

This study was supported by the Deputy for Research and Technology of Guilan University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Conceptualization, editing, review, and supervision: Mona Haddad Zahmatkesh; Writing the article: Saeedeh Rahmatpour; Radiotherapy: Hamid Saeedi Saedi; Experimental test: Mona Haddad Zahmatkesh and Saeedeh Rahmatpour.

Conflicts of interest

The author declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Vice Chancellor for Research of Guilan University of Medical Sciences.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

بررسی اثر حساس‌کنندگی پرتویی تولمتین در درمان رادیوتراپی بر روی سلول سرطان کلون انسانی HT-29

سعیده رحمت‌پور[۱]، حمید سعیدی ساعدی[۲]، *مونا حداد زحمت‌کش[۳]

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۲.گروه رادیولوژی، مرکز تحقیقات غربالگری و پیش گیری از سرطان‌های گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۳. گروه بیوتکنولوژی دارویی-داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۳ مرداد ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۰۳ مهر ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۰

چکیده

زمینه رادیوتراپی یکی از روش‌های درمان سرطان است.اگرچه مقاومت به اشعه و ایجاد سمیت در سلول‌های نرمال استفاده از رادیوتراپی را در بعضی موقعیت‌های آناتومیکالی خاص محدود می‌کند، با این حال همراه با رادیوتراپی استفاده از موادی که حساسیت به اشعه را بر سلول‌های سرطانی افزایش داده و در عین حال سمیت سلولی بر سلول‌های نرمال نداشته باشند، می‌تواند مفید باشد.

هدف هدف این مطالعه بررسی اثر حساس‌کنندگی پرتویی تولمتین در درمان رادیوتراپی بر روی سلول سرطان کلون انسانی HT-29 بود.

روش‌ها در این مطالعه، سلول‌های سرطان کلون انسانی HT-29 در گروه‌های مختلف تحت تابش ۴ گری اشعه ایکس و داروی تولمتین (با غلظت‌های ۷۵ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) قرار گرفتند و با روش ارزیابی میکرونوکلئوس و شاخص تقسیم هسته‌ای، با یکدیگر و با گروه کنترل مقایسه شدند. اثر سیتوتوکسیسیته با شاخص تقسیم هسته‌ای و ژنوتوکسیسیته سلول‌ها با روش ارزیابی تعداد میکرونوکلئوس‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها در گروه دریافت‌کننده اشعه ، تعداد میکرونوکلئوس‌ها در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری افزایش پیدا کرد.در گروه دریافت کننده تولمتین با غلظت ۷۵ و ۱۰۰ میکرو مولار نیز همچنین تعداد میکرونوکلئوس‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. در کلیه گروه‌های تیمار شده با تولمتین که اشعه نیز دریافت کرده‌اند افزایش معنی‌داری در تعداد میکرونوکلئوس‌ها مشاهده شد که این افزایش در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار محسوس‌تر بود. در همین حال تولمتین در غلظت‌های مورد مطالعه در شاخص تقسیم هسته‌ای تغییری ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری مطالعه حاضر نشان داد که تولمتین دارای اثر حساس‌کنندگی پرتوی بر سلول‌های سزطان کولون انسانی HT-29 است که این اثر به غلظت تولمتین وابسته است. علاوه بر آن تولمتین واجد اثر سیتوتوکسیسیته بر رده سلولی مذکور نیست.

کلیدواژه‌ها:
حساس‌کنندگی پرتوی، تولمتین، میکرونوکلئوس، سرطان کلون انسانی HT-29

مقدمه

رادیوتراپي یکی از روش‌های رایج درمان سرطان است که به تنهایی یا همراه با شیمی درمانی به کار گرفته می‌شود. تابش یونیزان مورد استفاده در پرتودرماني، یک عامل فیزیکي است که برای از بین بردن سلول‌های سرطاني مورد استفاده قرار می‌گیرد. اشعه پر انرژی باعث آسیب رساندن به مواد ژنتیکي (DNA) سلول‌ها و درنتیجه مسدود کردن توانایي آن‌ها برای تقسیم و تکثیر بیشتر می‌شود. گرچه تابش موجب خسارت بر هر دو سلول طبیعي و سلول سرطاني می‌شود، هدف از پرتودرماني از بین بردن حداکثر سلول‌های سرطانی با حداقل آسیب به بافت‌های سالم است. باید توجه داشت که سلول‌های سرطاني در مقایسه با سلول‌های سالم در بازسازی آسیب‌های ناشي از اشعه کارآمد نیستند. مقاومت در برابر اشعه به عنوان یکي از نقص‌های ذاتي سیستم درماني مطرح است که هنوز هم بین فواید درماني و معایب فیزیولوژیک آن اختلاف نظر وجود دارد. رویکرد چندگانه‌ای برای افزایش اثر بخشي پرتودرماني در عین کاهش سمیت وجود دارد که عبارت‌اند از

* **نویسنده مسئول:**
دکتر مونا حداد زحمت‌کش
نشانی: رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی-داروسازی هسته‌ای.
تلفن: ۳۳۴۸۶۴۷۰ (۱۳) ۹۸+
رایانامه: haddad@gums.ac.ir

افزایش محافظت پرتوی سلول‌های بافت سالم، عدم مقاومت به تابش در بافت سرطاني و افزایش حساسیت پرتوی بافت سرطاني [۱]. تابش‌های یونیزان از جمله عوامل ایجادکننده صدمات ساختاری به کروموزوم‌ها هستند [۲]. ریزهسته (میکرونوکلئوس) قطعه‌ای از کروموزوم یا تمام یک کروموزوم است که در طول تقسیم هسته در زمان آنافاز (جدایی کروموزوم‌ها) وارد هسته سلول دختر نمی‌شود. تابش یونیزان به عنوان عاملی که سبب القای تشکیل ریزهسته در سلول‌ها می‌شود، شناخته شده است که درواقع این امر نشانه‌ای از ایجاد آسیب ژنتیکی توسط تابش است. در حال حاضر از این روش به عنوان یک مارکر زیستی جهت تخمین دُز تابشی جذب‌شده استفاده می‌شود. افزایش تشکیل ریزهسته در سلول‌ها نیز در پی مصرف بسیاری از ترکیبات حساس کننده در برابر تابش مشاهده شده است [۱]. نقش صدمات ماده ژنتیکي و کروموزوم‌ها در ایجاد سرطان موضوعي است که مطالعات زیادی را به خود اختصاص داده است [۳]. برای مثال وجود چندین ناهنجاری ساختاری کروموزومي در تومورهای جامد از جمله سرطان کلون [۴، ۵] مشاهده شده است. سرطان کلون به عنوان چهارمین علت مرگ‌ومیر ناشي از سرطان شناخته می‌شود [۶]. ارتباط بین التهاب و سرطان به‌خوبی شناخته شده است. داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAID)[1] دسته خوبي از داروهای ضدالتهاب هستند که آنزیم سیکلواکسیژناز (cox) را مهار می‌کنند [۷]. مطالعات زیادی، توانایي بسیاری از عوامل ضدالتهابي به‌خصوص NSAIDها، برای مهار رشد تومور نشان می‌دهد. به علاوه کاهش قابل توجهي در مرگ‌و میر ناشي از سرطان کلون در ارتباط با استفاده از NSAIDها گزارش شده است [۸-۱۰]. همچنین اثر آپوپتوزی و مهار رشد تومور بعضي ترکیبات مشتق شده از NSAIDها گزارش شده است [۱۱-۱۴]. تولمتین داروی ضدالتهاب غیر استروئیدی (NSAID) است که سنتز پروستوگلندین‌ها را مهار می‌کند و همچنین اثر تنظیمي تولمتین در دارودرماني ضد سرطان مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته شده است و نشان داده شده است که تولمتین و سایر NSAIDها با مکانیسم مهار ß-catenin [۱۵]. اثر توکسیسیته داروهای ضدسرطان را افزایش می‌دهند [۱۶]. به همین علت تولمتین به عنوان توسعه‌دهنده عوامل ضد سرطان جدید شناخته می‌شود [۱۵]. همان‌طور که اشاره شد، برای کنترل تومورها بدون افزایش سمیت در بافت طبیعي به حساس‌کننده پرتویي انتخابي نیاز است. عوامل جدید متعددی در مطالعات پیش‌بالین، فعالیت امیدوارکننده‌ای را در این زمینه از خود نشان داده‌اند اما تعداد کمي از آن‌ها فراتر از مراحل اولیه توسعه بالیني پیشرفت کرده‌اند [۱۷]. از آنجا که سطح بالا از اشعه یونیزان باعث ایجاد سطح بالایي از استرس اکسیداتیو می‌شود که برای بافت طبیعي اطراف تومور نیز سمي است، پس استفاده از یک عامل حساس‌کننده همراه پرتو یونیزان مطلوب است تا سمیت را در سلول‌های سرطاني افزایش و در عین حال مواجهه را در سلول‌های نرمال کم کند [۱۸]. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر حساس‌کنندگي پرتوی تولمتین در درمان رادیوتراپي بر روی رده سلولي سرطان کولون HT-29 است. در این راستا از آزمون تخمین ریزهسته‌ها که به عنوان یک روش قابل قبول در مطالعات سمیت ژنتیکی مورد تأیید است، استفاده خواهد شد [۱۹] و از شاخص تقسیم هسته‌ای (NDI)[2] برای بررسی اثر سیتوتوکسیک دارو استفاده می‌شود [۲۰].

روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه آزمایشگاهی است که پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم‌پزشکی گیلان با کد اخلاق IR.GUMS.REC.1398.490 بر روی رده سلولی HT-29 انجام شد.

کشت سلولی

رده سلولی سرطان کلون انسانی HT-29(38-ATCC-HTB) از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران خریداری شد.سلول‌ها در محیط کشت RPMI (Dacell) حاوی ۱۰ درصد سرم گاو جنینی (Gibco)، استرپتومایسین ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و پنی‌سیلین (Gibco) ۵۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کشت داده شدند. درنهایت در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند.. پس از شروع کشت سلولی، بسته به تعداد سلول‌ها و حجم محیط کشت، تعویض دوره‌ای محیط کشت سلول‌ها (هر ۳ روز یک بار) به منظور پیشگیری از تغییر رنگ و افزایش اسیدیته آن صورت گرفت به طوری که سلول‌ها در تراکم سلولی ۸۰ درصد با استفاده از محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد (Gibco) تریپسینه شده و پاساژ داده شدند.

تیمار سلول‌ها

سلول‌های HT-29 در تعداد ۴۰۰۰۰۰-۳۰۰۰۰۰ سلول در پلیت‌های ۱۲ خانه کشت داده شدند. غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار از داروی تولمتین تهیه شدند. سلول‌ها به ۸ گروه تقسیم شدند؛ شامل: گروه ۱ (کنترل)، گروه ۲ (اشعه)، گروه ۳ (حاوی تولمتین ۷۵ میکرومولار)، گروه ۴ (حاوی تولمتین ۱۰۰میکرومولار)، گروه ۵ (حاوی تولمتین ۱۵۰ میکرومولار)، گروه ۶ (اشعه+تولمتین ۷۵)، گروه ۷ (اشعه+تولمتین ۱۰۰)، گروه ۸ (اشعه+تولمتین ۱۵۰). ۳ ساعت قبل از پرتوگیری، سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های تعیین‌شده تولمتین قرار گرفتند. به طوری که بر اساس گروه‌های مذکور

1. Non-steroidal anti-inflammatory drugs

2. Nuclear Division Index

۱۰۰ میکرولیتر محلول تولمتین با غلظت مشخص به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد.

پرتودهی و تیمار مجدد

پرتودهی در مرکز رادیوتراپی و انکولوژی گیلان در شهر رشت انجام شد. برای پرتودهی از دستگاه linear accelera-tor (شتاب‌دهنده خطی) شرکت Shinva استفاده شد. اشعه ایکس با دُز ۴ گری و سرعت دُز ۱/۹۶ گری / دقیقه و با حفظ فاصله تا منبع تابش ۶۰ سانتی‌متر به گروه‌های اشعه دیده تابیده شد. بعد از دریافت اشعه پلیت‌ها به درون انکوباتور بادمای ۳۷ درجه، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد منتقل شدند. ۴۸ ساعت پس از زمان تابش اشعه، سلول‌ها جهت توقف تکثیر و دو هسته‌ای شدن با ۱۰۰ میکرولیتر سایتوکالازین بی (Sigma-Aldrich) با غلظت ۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر تیمار شدند تا ریزهسته‌ها قابل تشخیص باشند [۱].

تست میکرونوکلئوس

سلول‌ها پس از ۲۸ ساعت بعد از اضافه کردن سیتوکلایزین بی، جمع‌آوری شدند. سوسپانسیون سلولی به مدت ۷ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. بعد از ثابتکردن سلول‌ها با محلول اسید استیک / متانول با نسبت ۶/۱، سلول‌ها به روی لام‌های تمیز و سرد منتقل شدند و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک شدند. رنگ‌آمیزی با گیمسا ۱۰ درصد انجام شد. در هر نمونه به ازای هر ۵۰۰ سلول دو هسته‌ای، تعداد سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس شمارش شده و میانگین تعداد میکرونوکلئوس در هر گروه به عنوان یک شاخص تعریف شد. جهت تعیین شاخص تقسیم هسته‌ای (NDI)، ۵۰۰ سلول از هر نمونه شمارش و تعداد سلول‌های یک، دو، سه و چهار هسته‌ای مشخص شد. شاخص NDI با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه می‌شود:

۱.

$$NDI=\frac{(m1+2(m2)+3(m3)+4(m4)}{N}$$

در رابطه فوق m1، m2، m3، m4 به ترتیب تعداد سلول‌های یک، دو، سه و چهار هسته‌ای و N تعداد کل سلول‌ها شمارش شده است [۱].

آنالیز آماری

در مطالعه حاضر مقادیر متغیرهای کمی به صورت انحراف معیار±میانگین نشان داده شد. جهت مقایسه میانگین متغیرهای موردبررسی بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه (و آزمون تعقیبی توکی) استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Prism نسخه ۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

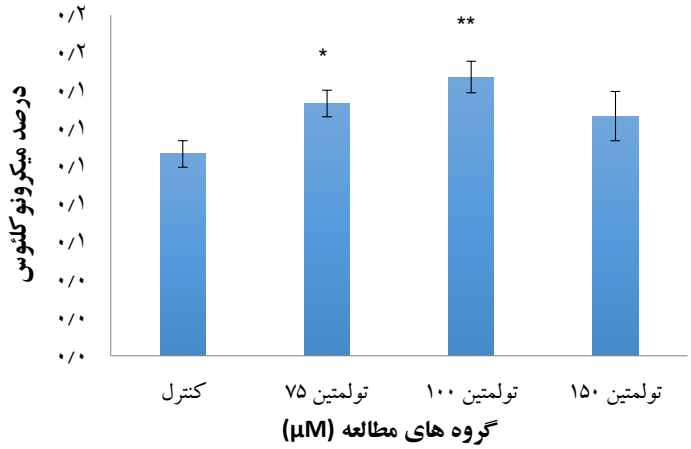
یافته‌ها

سنجش میزان حساسیت پرتوی تولمتین بر سلول‌های HT-۲۹ به کمک آزمون میکرونوکلئوس

به منظور سنجش میزان حساسیت پرتوی تولمتین، غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار از تولمتین با سلول‌های HT-29 به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. سلول‌های گروه کنترل و گروه اشعه (گروهی که صرفاً تحت تابش اشعه یونیزان قرار می‌گیرد) به طور هم‌زمان کشت داده شدند.سپس یک گروه از هر غلظت و گروه اشعه، تحت ۴ گری تابش اشعه ایکس قرار گرفتند. برای توقف تولید سلول‌های دوهسته‌ای از سایتوکلایزین بی استفاده

جدول ۱. میانگین درصد ریزهسته و NDI تولیدشده در سلول‌های HT-29

شماره گروه	گروه‌های تیمارشده	میانگین±انحراف‌معیار	
		ریزهسته در سلول‌های HT-29 دوهسته‌ای	NDIدر سلول‌های HT-29 دوهسته‌ای
۱	کنترل	۰/۱۱±۰/۰۱	۱/۳۵±۰/۱۰
۲	اشعه دیده	۰/۶۳±۰/۰۳	۱/۰۱±۰/۰۷
۳	تولمتین ۷۵ میکرومولار	۰/۱۳±۰/۰۱	۱/۲۰±۰/۱۹
۴	تولمتین ۱۰۰ میکرومولار	۰/۱۵± ۰/۰۱	۱/۰۶±۰/۰۴
۵	تولمتین ۱۵۰ میکرومولار	۰/۱۲±۰/۰۱	۱/۲۵±۰/۰۸
۶	تولمتین ۷۵ میکرومولار + اشعه	۰/۶۸±۰/۰۲	۰/۹۹±۰/۰۲
۷	تولمتین ۱۰۰ میکرومولار + اشعه	۰/۹۱±۰/۰۱	۰/۹۰±۰/۰۴
۸	تولمتین ۱۵۰ میکرومولار + اشعه	۰/۷۹±۰/۰۱	۱/۰۱±۰/۰۳



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

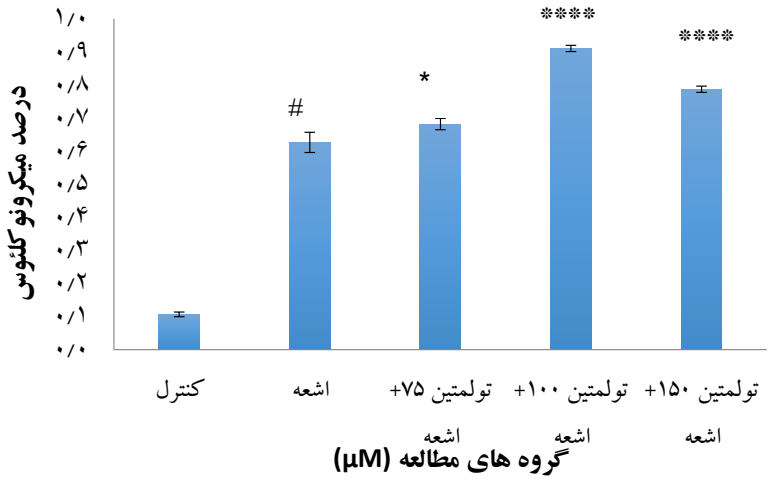
تصویر ۱. اثر سمیت ژنتیکی ایجادشده توسط تولمتین (در غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) در سلول‌های HT-29 با سنجش تعداد میکرونکلئوس‌ها در گروه‌های بدون دریافت اشعه

درصد تعداد میکرونکلئوس‌ها در گروه‌های موردمطالعه نشان داده شده است. مقادیر به صورت میانگین انحراف معیار با ۳ بار تکرار در آزمایشات مستقل نمایش داده شده است. تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل (*P<۰/۰۲۳ و **P<۰/۰۰۳).

شد. بعد از برداشت و رنگ‌آمیزی سلول‌ها، سنجش آزمون میکرونوکلئوس (شمارش سلول‌های دوهسته‌ای دارای ریزهسته) برای همه گروه‌ها انجام شد. نتایج حاصل از ۳ مرتبه تکرار در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. میانگین درصد شاخص میکرونوکلئوس در گروه‌های ۸ گانه به ترتیب ۰/۱۱±۰/۰۱، ۰/۶۳±۰/۰۳، ۰/۱۳±۰/۰۱، ۰/۱۵±۰/۰۱، ۰/۱۲±۰/۰۱، ۰/۶۸±۰/۰۲، ۰/۰۹۱ ±۰/۰۱، ۰/۷۹ ±۰/۰۱ است. اثر تولمتین بر تولید میزان ریز هسته‌ها در سلول‌های HT -۲۹ بدون دریافت اشعه در تصویر شماره ۱ نمایش داده شده است. همان‌طور که از نتایج مشخص است اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تحت تیمار با غلظت تولمتین ۷۵ و ۱۰۰ میکروکولار با گروه کنترل مشاهده شد (P< ۰/۰۵). در کلیه گروه‌های دریافت‌کننده اشعه (تصویر شماره ۲) تفاوت معناداری با گروه اشعه تنها مشاهده شد (P<۰/۰۵) که این تفاوت در گروه‌های تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار تولمتین بارز تر بود و علاوه بر آن تفاوت بین گروه اشعه و گروه کنترل نیز معنادار بود (P<۰/۰۵).

سنجش میزان سیتوتوکسیسیته تولمتین بر سلول‌های HT-۲۹ به کمک ارزیابی شاخص تقسیم هسته‌ای

به منظور سنجش میزان سیتوتوکسیسیته تولمتین بر

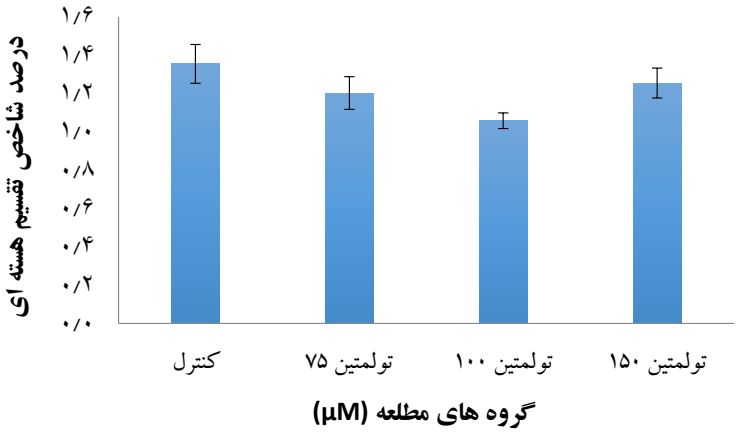


مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۲. اثر سمیت ژنتیکی ایجادشده توسط تولمتین (در غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) در سلول‌های HT-29 با سنجش تعداد میکرونکلئوس‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده اشعه (۴ گری)

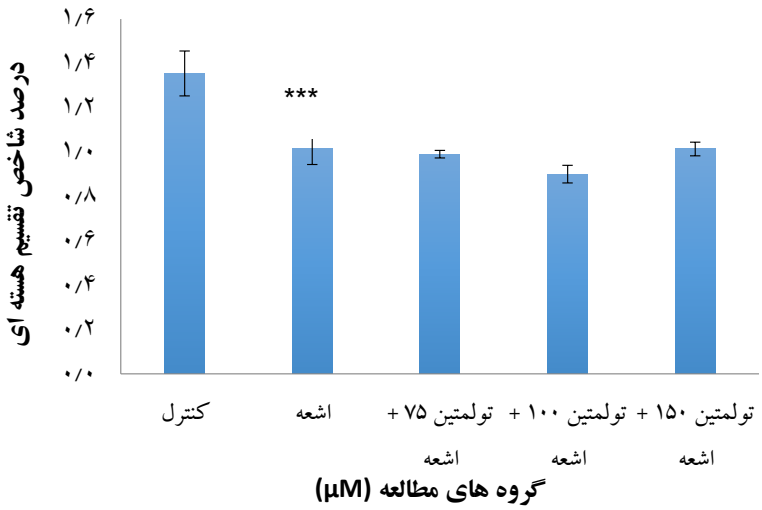
درصد تعداد میکرونکلئوس‌ها در گروه‌های موردمطالعه نشان داده شده است. مقادیر به صورت میانگین انحراف معیار با ۳ بار تکرار در آزمایشات مستقل نمایش داده شده است. تفاوت معنی‌دار با گروه اشعه (*P<۰/۰۱۷ و ****P<۰/۰۰۱).

تفاوت معنادار با گروه کنترل (#P<۰/۰۰۱).

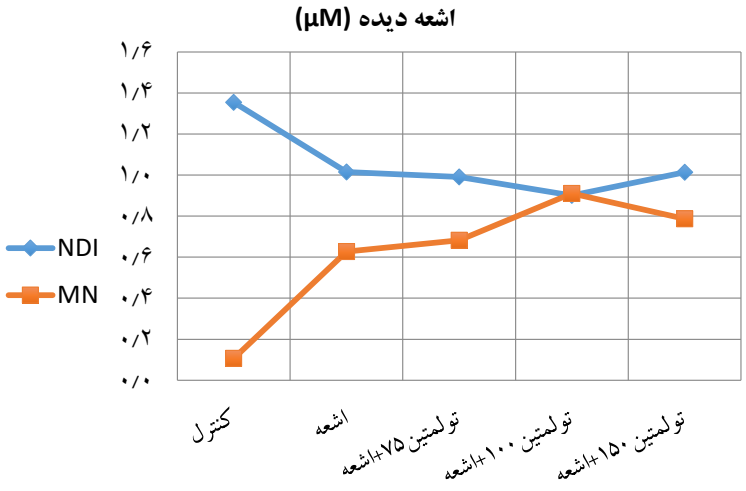


تصویر ۳. اثر سمیت سیتوپلاسمی ایجادشده توسط تولمتین (در غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) در سلول‌های HT-29 با سنجش شاخص تقسیم هسته‌ای (NDI) در گروه‌های بدون دریافت اشعه
درصد شاخص تقسیم هسته‌ای در گروه‌های موردمطالعه نشان داده شده است. مقادیر به صورت میانگین±انحراف معیار با ۳ بار تکرار در آزمایشات مستقل نمایش داده شده است.

سلول‌های HT-29، غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار از تولمتین با سلول‌ها به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. سلول‌های گروه کنترل و گروه اشعه به طور هم‌زمان کشت داده شدند. سپس یک گروه از هر غلظت و گروه اشعه، تحت ۴ گری تابش اشعه ایکس قرار گرفتند. برای توقف تولید سلول‌های دوهسته‌ای از سایتوکلازیزین بی استفاده شد. بعد از برداشت و رنگ‌آمیزی سلول‌ها، سنجش ارزیابی شاخص تقسیم هسته‌ای به کمک شمارش سلول‌های یک، دو، سه و چهار هسته‌ای برای همه گروه‌ها انجام شد. نتایج حاصل از ۳ مرتبه تکرار در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. میانگین درصد NDI در گروه‌های موردمطالعه به ترتیب ۱/۳۵±۰/۰۱، ۱/۰۱±۰/۰۷، ۱/۲۰±۰/۱۹، ۱/۰۶±۰/۰۴، ۱/۲۵±۰/۰۸، ۰/۹۹±۰/۰۲، ۰/۹۰±۰/۰۴، ۱/۰۱±۰/۰۳ بود. اثر تولمتین بر تغییرات شاخص تقسیم هسته‌ای در سلول‌های HT-29 بدون دریافت اشعه در تصویر شماره ۳ نمایش داده شده است. همان‌طور که از نتایج مشخص است بین کلیه گروه‌های تحت تیمار با تولمتین در



تصویر ٤. اثر سمیت سیتوپلاسمی ایجادشده توسط تولمتین (در غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) در سلول‌های HT-۲۹ با سنجش شاخص تقسیم هسته‌ای (NDI) در گروه‌های بدون دریافت اشعه
درصد شاخص تقسیم هسته‌ای در گروه‌های موردمطالعه نشان داده شده است. مقادیر به صورت میانگین±انحراف معیار با ۳ بار تکرار در آزمایشات مستقل نمایش داده شده است. تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (***P<۰/۰۰۱).



تصویر ۵. مقایسه میانگین درصد شاخص تقسیم هسته‌ای و میانگین درصد تعداد میکرونوکلئوس‌ها در سلول‌های HT-29 در گروه‌های دریافت‌کننده اشعه (۴ گری) و گروه‌های دریافت‌کننده هم‌زمان اشعه و تولمتین (در غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار)

مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری در میانگین شاخص تقسیم هسته‌ای مشاهده نشد. در گروه‌های دریافت‌کننده اشعه (تصویر شماره ۴) در تمام گروه‌های تحت تیمار با تولمتین در مقایسه با گروه اشعه تفاوت معناداری در میزان درصد NDI نشان داده نشد. صرفاً تفاوت معناداری بین گروه دریافت‌کننده اشعه به‌تنهایی و گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

پرتودرمانی در کنار شیمی‌درمانی نقش برجسته‌ای در درمان اکثر سرطان‌ها دارد. هدف در پرتودرمانی رساندن حداکثر پرتو به بافت توموری با کمترین میزان آسیب به سلول‌های سالم است به طوری که ضمن از بین بردن توده‌های سرطانی یا کوچک کردن آن‌ها، سلول‌های سالم اطراف متحمل آسیب نشوند. مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر اشعه یونیزان یک چالش در رژیم رادیوتراپی در بیماران است. سلول‌های سرطانی مسیرهای مختلف سیگنالینگ را فعال می‌کنند که منجر به مقاومت در برابر مرگ سلولی ناشی از اشعه می‌شود [۲۱]. از این رو استفاده از عوامل یا ترکیباتی که بتوانند سلول‌های توموری را به اشعه حساس کرده و همچنین دُز پرتوی رسیده به بیمار را به حداکثر برسانند مورد توجه خواهد بود. مطلوب آن است که این ترکیبات دارای کمترین عارضه جانبی بوده، سمیت سلولی نداشته، ارزان و در دسترس عموم باشند.

در سال‌های اخیر مطالعات روزافزونی در زمینه بررسی اثرات حساس‌کنندگی پرتوی NSAIDها انجام شده است. به عنوان مثال سید جلال حسینی مهر و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثرات حساس کننده پرتوی مفنامیک اسید با اشعه یونیزان بر رده سلولی سرطان کلون HT-29 پرداختند. سلول‌ها تحت تابش اشعه یونیزان با دُز ۴ گری قرار گرفتند و در گروه‌هایی با حضور مفنامیک اسید در مقایسه با گروهی که در معرض مفنامیک اسید قرار نداشتند به میزان چشم‌گیری ریز هسته‌ها افزایش پیدا کرد [۱].

مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۸ توسط میر هلال احمد و همکارانش در ارزیابی اثر استرس اکسیداتیو و هیپاتوتوکسیسیته و ژنوتوکسیسیته ناپروکسن روی موش‌ها ویستار نر نشان داد ناپروکسن با افزایش میکرونوکلئوس باعث افزایش قابل توجهی در آسیب DNA می‌شود؛ همچنین تیمار با ناپروکسن منجر به عدم تعادل بیوشیمیایی و استرس اکسیداتیو می‌شود که منجر به از بین رفتن یکپارچگی سلول‌ها و آسیب قابل توجهی به ماده ژنتیکی و تأثیر عملکرد کبد در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار می‌شود، بنابراین ناپروکسن، یک عامل ژنوتوکسیک بالقوه شناخته می‌شود [۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر، تولمتین از جمله داروهایی بود که اثر کشندگی سلول‌های سرطانی را توسط سیکلوفسفامید افزایش داد بدون اینکه اثر سمی قابل توجهی بر سلول‌ها مغز استخوان CFU-GM داشته باشد [۲۳].

مطالعه‌ای دیگر در بررسی اثر NSAIDها که توسط آیدا پویافر و همکارانش در سال ۲۰۱۹ انجام شد و به بررسی اثر سیتوتوکسیک رزوراترول و سولینداک در رده سلول سرطان کلون انسانی HT-29 پرداخت. که نشان داده شد هر دو، بقای سلول سرطان کلون انسانی HT-29را مهار یا کاهش می‌دادند [۲۴].

همچنین در سال ۲۰۱۵ مشتقات جدیدی از تولمتین طراحی و در شرایط آزمایشگاهی بر روی رده سلولی سرطان کلون انسانی HT-29 مورد ارزیابی قرار گرفتند و برای تعیین مهار رشد و زنده ماندن سلول‌ها از روش MTT استفاده شد. نتایج

نشان داد که فعالیت ضدسرطانی مشتقات تولمتین به دلیل فعال شدن کاسپاز -۸ و کاسپاز -۹ دخیل در مسیر آپوپتوز است [۲۵]. مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۹ به بررسی اثر حساس‌کنندگی پرتوی ۵-آمینو لوولینیک اسید بر رده سلول سرطان کولون انسانی HT-29 در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی پرداخت. نتایج کار نشان داد که در شرایط برون‌تنی، سلول‌های تیمارشده با ۵-آمینو لوولینیک اسید که به صورت چنددزی تابش‌دهی شده بودند به صورت معناداری میزان بقا در آن‌ها کاهش یافت و علاوه بر آن در شرایط درون‌تنی حجم توده سرطانی زنوگرافت شده بعد از رادیوتراپی به همراه ترکیب مذکور در مقایسه با توده‌هایی که ۵-آمینو لوولینیک اسید را دریافت نکرده بودند به صورت قابل توجهی کوچک‌تر شده بود [۲۶]. به این ترتیب مطالعات اثربخشی ترکیباب حساس‌کننده پرتوی در میزان موفقیت پروسه درمانی رادیوتراپی را به‌وضوح نشان می‌دهند.

در مطالعه حاضر ما اثر حساس‌کنندگی پرتویی تولمتین در درمان رادیوتراپی بر روی سلول سرطان کلون انسانی HT-29 را مورد بررسی قرار دادیم. در مطالعه حاضر با انجام آزمون ریزهسته در سلول‌های سرطانی HT-29 که تحت تابش یونیزان قرار نگرفته بودند، همه گروه سلول‌های تیمارشده با تولمتین، باعث افزایش ریزهسته‌ها شدند ولی تنها در غلظت ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار سبب ایجاد اثرات حساس‌کنندگی پرتوی معناداری در سلول‌های توموری شدند (P<۰/۰۵). همچنین با انجام آزمون ریزهسته در سلول‌های سرطانی HT-29 که تحت تابش یونیزان قرار گرفته بودند، مشخص شد علاوه بر اینکه گروه دریافت‌کننده اشعه تفاوت معناداری با گروه کنترل داشت (P< ۰/۰۵)، سلول‌های تیمارشده با داروی مذکور در کلیه غلظت‌های موردمطالعه با گروه دریافت‌کننده اشعه تنها، تفاوت معنادار داشتند (P<۰/۰۵) و سبب ایجاد اثرات حساس‌کنندگی پرتوی در سلول‌های توموری شدند .بیشترین ریزهسته‌های ایجادشده در غلظت ۱۰۰ میکرومولار دیده شد که نشان‌دهنده بیشترین اثرگذاری دارو در این غلظت و اثر بهینه آن است (تصویر شماره ۵).

در بررسی اثرات سیتوتوکسیک دارو تولمتین در سلول‌های سرطانی HT-29 که تحت تابش یونیزان قرار نگرفته بودند، کاهش در شاخص NDI دیده شد، ولی از نظر آماری معنادار نبود. همچنین اثر داروی تولمتین بر سیتوتوکسیسیته ناشی از اشعه یونیزان بر رده سلول سرطان کلون انسانی HT-29 با استفاده از شاخص NDI بررسی شد. نتایج حاصل از مطالعه بر روی سلول‌های HT-29 در این تحقیق نشان می‌دهند که تولمتین در غلظت‌ها مورد مطالعه واجد اثرات سیتوتوکسیسیته بر سلول‌های توموری نیست.

بر مبنای نتایج این مطالعه، تولمتین در غلظت‌های موردمطالعه واجد اثرات حساس‌کنندگی پرتوی بر سلول هلی توموری است و علاوه بر آن تولمتین در غلظت‌های موردمطالعه واجد اثرات سیتوتوکسیسیته بر سلول‌های توموری نیست. مکانیسم‌های شناخته‌شده در افزایش حساسیت به پرتو توسط داروهای ضدالتهاب شامل مهار آنزیم سیکلواکسیزناز-۲ و متعاقب آن کاهش و یا توقف تولید پروستوگلاندین‌ها و درنتیجه افزایش آپوپتوز و کاهش رگ‌زایی و رشد است. همچنین توقف سیکل سلولی در منطقه G1-S به عنوان یکی از مناطق حساس در این چرخه باید مورد توجه قرار گیرد. حال اینکه با چه مکانیسمی این توقف صورت می‌گیرد به طور کامل تا کنون شناخته نشده است. مکانیسم حساس‌کنندگی پرتوی سلول‌های تومورال در رادیوتراپی توسط داروهای دسته NSIAD به طور کامل شناخته نشده است و مورد اصلی بحث ما نیز قرار ندارد، ولی به طور کلی می‌توان گفت که داروهای ضدالتهاب به عنوان حساس‌کننده‌های پرتوی، منحنی پاسخ به اشعه را به سمت راست منتقل می‌کنند. با توجه اینکه مطالعه انجام‌شده اولین مطالعه در زمینه اثر حساس‌کنندگی پرتوی داروی تولمتین بر میزان آسیب حاد ناشی از اشعه یونیزان بر رده سلول سرطان کولون انسانی HT-29 است، نظر به نتایج مثبت حاصله از این پژوهش پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی میزان فاکتورهای التهابی نیز در این سلول‌ها اندازه‌گیری شود همچنین مناسبت‌تر خواهد بود که مطالعه در شرایط درون‌تنی و بر روی موش‌های مبتلا به سرطان کولون نیز انجام شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه برگرفته از طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.GUMS.REC.1398.490 است که توسط دانشگاه علوم‌پزشکی گیلان تأیید شده است. کلیه اصول اخلاقی در این مقاله رعایت شده است.

حامی مالی

پژوهش حاضر با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام گرفته است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، ویرایش، مرور و نظارت: مونا حداد زحمت‌کش؛ نگارش: سعیده رحمت‌پور؛ پرتودرمانی: حمید سعیدی ساعدی؛ تست‌های آزمایشگاهی: مونا حداد زحمت‌کش و سعیده رحمت‌پور.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان برای حمایت از این پژوهش تشکر وقدردانی کنند.

References

[1] Hosseinimehr SJ, Safavi Z, Kangarani Farahani S, Noaparst Z, Ghasemi A, Asgarian-Omran H. The synergistic effect of mefenamic acid with ionizing radiation in colon cancer. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 2019; 51(3):249-57. [DOI:10.1007/s10863-019-09792-w] [PMID]

[2] Chandra Jagetia G, Reddy TK. Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin. Life Sciences. 2005; 77(7):780-94. [DOI:10.1016/j.lfs.2005.01.015] [PMID]

[3] Zimonjic D, Brooks MW, Popescu N, Weinberg RA, Hahn WC. Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. Cancer Research. 2001; 61(24):8838-44. [PMID]

[4] Stewénius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Höglund M, Mandahl N, et al. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005; 102(15):5541-6. [DOI:10.1073/pnas.0408454102] [PMID] [PMCID]

[5] Mohr B, Illmer T. Structural chromosomal aberrations in the colon cancer cell line HCT 116-results of investigations based on spectral karyotyping. Cytogenetic and Genome Research. 2005; 108(4):359-61. [DOI:10.1159/000081532] [PMID]

[6] Beck DE, Roberts PL, Rombeau JL, Stamos MJ, Wexner SD. Colorectal cancer: Epidemiology, etiology, and molecular basis. In: Wexner SD, Stamos MJ, Rombeau J, Roberts Pl, Beck DE, editors. The ASCRS Manual of Colon and Rectal Surgery. New York: Springer; 2009. pp. 463-484. [DOI:10.1007/b12857_23]

[7] Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. Scandinavian Journal of Rheumatology. 1996; 102:9-21. [PMID]

[8] Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: Case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. Cancer Research. 1988; 48(15):4399-404. [PMID]

[9] Thun MJ, Namboodiri MM, Heath Jr CW. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. The New England Journal of Medicine. 1991; 325(23):1593-6. [DOI:10.1056/NEJM199112053252301] [PMID]

[10] Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. Annals of Internal Medicine. 1994; 121(4):241-6. [DOI:10.7326/0003-4819-121-4-199408150-00001] [PMID]

[11] Çıkla P, Özsavcı D, Bingöl-Özakpınar Ö, Şener A, Çevik Ö, Özbaş-Turan S, et al. Synthesis, cytotoxicity, and pro-apoptosis activity of etodolac hydrazide derivatives as anticancer agents. Archiv der Pharmazie. 2013; 346(5):367-79. [DOI:10.1002/ardp.201200449] [PMID]

[12] Küçükgüzel ŞG, Coşkun I, Aydın S, Aktay G, Gürsoy Ş, Çevik Ö, et al. Synthesis and characterization of celecoxib derivatives as possible anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, anticancer and anti-HCV agents. Molecules. 2013; 18(3):3595-614. [DOI:10.3390/molecules18033595] [PMID] [PMCID]

[13] Çıkla P, Tatar E, Küçükgüzel I, Şahin F, Yurdakul D, Basu A, et al. Synthesis and characterization of flurbiprofen hydrazide derivatives as potential anti-HCV, anticancer and antimicrobial agents. Medicinal Chemistry Research. 2013; 22(12):5685-99. [DOI:10.1007/s00044-013-0550-3]

[14] Aydın S, Kaushik-Basu N, Özbaş-Turan S, Akbuğa J, Mega Tiber P, Orun O, et al. Synthesis of 1-aroyl-3, 5-dimethyl-1H-pyrazoles as Anti-HCV and anticancer agents. Letters in Drug Design & Discovery. 2014; 11(2):121-31. [DOI:10.2174/15701808113109990069]

[15] Lu D, Cottam HB, Corr M, Carson DA. Repression of β-catenin function in malignant cells by nonsteroidal antiinflammatory drugs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America. 2005; 102(51):18567-71. [DOI:10.1073/pnas.0509316102] [PMID] [PMCID]

[16] Duffy CP, Elliott CJ, O'Connor RA, Heenan MM, Coyle S, Cleary IM, et al. Enhancement of chemotherapeutic drug toxicity to human tumour cells in vitro by a subset of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). European Journal of Cancer. 1998; 34(8):1250-9. [DOI:10.1016/S0959-8049(98)00045-8] [PMID]

[17] Dillon MT, Harrington KJ. Human papillomavirus-negative pharyngeal cancer. Journal of Clinical Oncology. 2015; 33(29):3251-61. [DOI:10.1200/JCO.2015.60.7804] [PMID]

[18] Malik A, Sultana M, Qazi A, Qazi MH, Parveen G, Waquar S, et al. Role of natural radiosensitizers and cancer cell radioresistance: An update. Analytical Cellular Pathology. 2016; 2016:6146595. [DOI:10.1155/2016/6146595] [PMID] [PMCID]

[19] Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1993; 285(1):35-44. [DOI:10.1016/0027-5107(93)90049-L] [PMID]

[20] Di Sotto A, Mazzanti G, Carbone F, Hrelia P, Maffei F. Inhibition by β-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2010; 699(1/2):23-8. [DOI:10.1016/j.mrgentox.2010.04.008] [PMID]

[21] Salehifar E, Hosseinimehr SJ. The use of cyclooxygenase-2 inhibitors for improvement of efficacy of radiotherapy in cancers. Drug Discovery Today. 2016; 21(4):654-62. [DOI:10.1016/j.drudis.2016.02.019] [PMID]

[22] Ahmad MH, Fatima M, Hossain M, Mondal AC. Evaluation of naproxen-induced oxidative stress, hepatotoxicity and in-vivo genotoxicity in male Wistar rats. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2018; 8(6):400-6. [DOI:10.1016/j.jpha.2018.04.002] [PMID] [PMCID]

[23] Teicher BA, Korbut TT, Menon K, Holden SA, Ara G. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors as modulators of cancer therapies. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 1994; 33(6):515-22. [DOI:10.1007/BF00686511] [PMID]

[24] Pouyafar A, Rezabakhsh A, Rahbarghazi R, Heydarabad MZ, Shokrollahi E, Sokullu E, et al. Treatment of cancer stem cells from human colon adenocarcinoma cell line HT-29 with resveratrol and sulindac induced mesenchymal-endothelial transition rate. Cell and Tissue Research. 2019; 376(3):377-88. [DOI:10.1007/s00441-019-02998-9] [PMID]

[25] Küçükgüzel ŞG, Koç D, Çıkla-Süzgün P, Özsavcı D, Bingöl-Özakpınar Ö, Mega-Tiber P, et al. Synthesis of tolmetin hydrazide-hydrazones and discovery of a potent apoptosis inducer in colon cancer cells. Archiv der Pharmazie. 2015; 348(10):730-42. [DOI:10.1002/ardp.201500178] [PMID]

[26] Yamada K, Murayama Y, Kamada Y, Arita T, Kosuga T, Konishi H , et al. Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid in colorectal cancer in vitro and in vivo. Oncology Letters. 2019; 17(6):5132-8. [DOI:10.3892/ol.2019.10198] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank