

# اثرات هم افزایی آسپارتیک اسید و توکوفرول بر سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از اتوپوزاید بر رده سلولی HepG2

محبوبه رحمتی کوکنده<sup>۱</sup>، مریم تنگستانی زاده<sup>۲</sup>، حورالعین عرب<sup>۳</sup>، الهه قره خانی<sup>۱</sup>، محمد شکرزاده<sup>۴\*</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** سرطان کبد یکی از مرگبارترین سرطان‌ها در سطح جهان است که یکی از داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده در درمان این سرطان، اتوپوزاید است که با مهار آنزیم توپوایزومراز II باعث توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز می‌گردد. با این حال، اتوپوزاید با ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر به استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات هم‌افزایی دو ترکیب آنتی‌اکسیدانی، آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید، بر سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو القا شده توسط اتوپوزاید در رده سلولی HepG2 بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه رده سلولی HepG2 با غلظت‌های گوناگون آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکرومولار) پیش تیمار شد. و سپس با اتوپوزاید (در غلظت ۷/۰۸ میکرومولار = IC50) القای سمیت سلولی صورت گرفت. در ادامه، پارامترهای لیپید پراکسیداسیون، گونه‌های فعال اکسیژن و زنده‌مانی سلولی اندازه‌گیری شدند. **نتایج:** با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان بقای سلولی و تست‌های استرس اکسیداتیو، آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید به همراه اتوپوزاید در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش باعث افزایش زنده‌مانی سلولی شدند و کاهش میزان MDA و ROS شدند. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید می‌تواند اثرات سمی اتوپوزاید را کاهش داده و با تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول، نقش محافظتی مؤثری ایفا نماید. این یافته‌ها بر قابلیت استفاده از این ترکیب به عنوان یک استراتژی درمانی مکمل در درمان سرطان کبد تأکید دارد.

**واژه‌های کلیدی:** اتوپوزاید، آسپارتیک اسید، آلفا-توکوفرول، استرس اکسیداتیو، تست MTT

**ارجاع:** رحمتی کوکنده محبوبه، تنگستانی زاده مریم، عرب حورالعین، قره‌خانی الهه، شکرزاده محمد. اثرات هم افزایی آسپارتیک اسید و توکوفرول بر سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از اتوپوزاید بر رده سلولی HepG2. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۱۰): ۹۵۰-۹۲۰.

۱- گروه سم‌شناسی و داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۲- پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران.

۳- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴- گروه سم‌شناسی و داروسازی، گروه سم‌شناسی و داروسازی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۵- مرکز تحقیقات علوم دارویی، موسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۱۲۶۳۴۴۸، پست الکترونیکی: Mslamuki@gmail.com

## مقدمه

سرطان کبد به عنوان هفتمین سرطان شایع و دومین سرطان کشنده در سطح جهانی شناخته می‌شود. کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) که ۷۵ تا ۸۵ درصد از کل موارد سرطان کبد را تشکیل می‌دهد، فرم غالب سرطان کبد است (۱). سه نوع روش جراحی شامل پیوند کبد، برداشت بخشی از کبد و تخریب بافت کبدی مؤثرترین روش‌های درمانی برای HCC به‌شمار می‌روند. با این حال، هیچ یک از این روش‌ها درمان دائمی ارائه نمی‌دهند و هر کدام محدودیت‌های خاص خود را دارند. علی‌رغم کاربرد محدود شیمی‌درمانی، داروهای خاصی مانند اتوپوزاید در مقابله با HCC مؤثر شناخته شده‌اند (۲). اتوپوزاید، مشتق نیمه‌صناعی از آنتی‌بیوتیک طبیعی پودوفیلوتوکسین، یک داروی مهم شیمی‌درمانی ضد سرطان است که با مهار آنزیم توپوایزومراز II و تکثیر DNA، رشد سلول‌های سرطانی را متوقف می‌کند (۳). گزارش‌های متعدد در شرایط آزمایشگاهی و مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که اتوپوزاید باعث القای آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) و پیری سلولی در خطوط سلولی مختلف می‌شود و اثرات ژنوتوکسیک متنوعی از جمله القای جهش و اختلال در سنتز DNA ایجاد می‌کند (۴). اکسیداسیون گروه‌های تیول توسط رادیکال‌های فنوکسی اتوپوزاید ممکن است منجر به کاهش سطح گلوتاتیون، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش آسیب اکسیداتیو به DNA شود که این امر به نوبه خود در تشکیل شکست‌های رشته‌ای DNA نقش دارد (۵). از آنجا که اتوپوزید عوارض جانبی متعددی برای بیماران به همراه دارد، جستجوی روش‌های نوین مانند درمان ترکیبی به منظور کاهش این عوارض و در عین حال افزایش اثرات ضدتوموری آن مورد توجه قرار گرفته است (۶). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نقش مهمی در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، بیماری‌های عصبی-تخریبی، سیستم تنفسی و دستگاه گوارش ایفا می‌کنند. سطوح بالای ROS در سلول‌های طبیعی باعث آسیب به DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها شده و به جهش‌زایی و تبدیل سلولی می‌انجامد. از سوی دیگر، سلول‌های سرطانی با سطوح بالای ROS ناشی از تغییرات متابولیک و افزایش نیاز

انرژی مشخص می‌شوند. ROS در مراحل مختلف توسعه سرطان مانند تبدیل سلولی، تهاجم و متاستاز نقش دارند (۷). از آنجا که استرس اکسیداتیو در آسیب‌های حاد و مزمن کبدی نقش دارد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گزینه مناسبی برای پیشگیری از آسیب کبدی به‌شمار می‌آید. آلفا-توکوفرول فعال‌ترین و مؤثرترین فرم ویتامین E است که به‌طور گسترده در طبیعت یافت می‌شود. خواص آنتی‌اکسیدانی آلفا-توکوفرول در توانایی آن برای حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده از بیومولکول‌های لیپیدی نهفته است و در نهایت زنجیره واکنش رادیکال‌های آزاد را متوقف می‌کند و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان محلول در چربی است که نقش مهمی در حفاظت از غشای سلولی در برابر آسیب اکسیداتیو ایفا می‌کند، هم‌چنین آلفا-توکوفرول می‌تواند خطر بسیاری از بیماری‌های مزمن مرتبط با استرس اکسیداتیو، از جمله سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش دهد (۸،۹). علاوه بر ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی، آلفا-توکوفرول به عنوان تنظیم‌کننده ژن‌های دخیل در متابولیسم و هموستازی لیپیدها، سیگنالینگ سلولی، تنظیم بیان ژن، التهاب و سیستم دفاع ایمنی عمل می‌کند (۱۰،۱۱). آسپارتیک اسید، که در فرم یونیزه خود به نام آسپارات نیز شناخته می‌شود، یک آمینواسید آلفا با فرمول شیمیایی  $C_4H_7NO_4$  است و به عنوان یک اسید آمینه غیرضروری محسوب می‌شود (۱۲). نقش آسپارتیک اسید به عنوان یک مهارکننده مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن، همراه با حمایت غیرمستقیم آن از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زا مانند گلوتاتیون، به‌طور مؤثری با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی و محلول در چربی آلفا-توکوفرول هماهنگ می‌شود. آلفا-توکوفرول به‌ویژه در خنثی‌سازی رادیکال‌های لیپید پراکسیل بسیار مؤثر است و بدین ترتیب از غشای سلولی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. وقتی آلفا-توکوفرول با آسپارتیک اسید ترکیب می‌شود- که نه تنها رادیکال‌های آزاد اکسیژن را حذف می‌کند، بلکه از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز، دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول را تقویت می‌کند- نتیجه، یک سیستم دفاعی جامع‌تر و قوی‌تر در برابر استرس اکسیداتیو خواهد بود

چاهک افزوده شد. سپس با دستگاه Elisa-reader جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۵).

**سنجش میزان ROS:** برای اندازه‌گیری میزان ROS از معرف DCFH-DA در گروه‌های کنترل و تیمار استفاده شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از معرف به نمونه سلولی اضافه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. سپس جذب توسط دستگاه فلوریمتری و در طول موج تحریکی ۳۱۲ نانومتر و طول موج نشری ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۶).

**سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO):** پس از انکوباسیون، سلول‌ها با استفاده از روش اسید تیوباربتوریک (TBA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور، به ۰/۲ میلی‌لیتر از هر یک از گروه‌های سوسپانسیون سلولی ۰/۱ میلی‌لیتر از معرف TBA اضافه شد. سپس مواد مذکور به‌طور کامل مخلوط شده، در حمام آب گرم قرار داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، ۰/۲ میلی‌لیتر *n*-بوتانول به مخلوط اضافه و کاملاً تکان داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت، لایه *n*-بوتانول در طول موج ۵۳۲ نانومتر جدا شده و میزان ترکیبات تیوباربتوریک اسید (TBARS) با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (۱۶).

### تجزیه تحلیل آماری

کلیه محاسبات آماری برای مقایسه  $IC_{50}$  ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism Ver.8 و به روش رگرسیون غیرخطی (nonlinear Regression) انجام شد و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Post test مربوطه (Tukey- Kramer multiple comprehension test) صورت گرفته و نمودارها توسط همین برنامه گرافیکی رسم شدند. حد معناداری ( $p < 0.05$ ) تعریف شده است.

### نتایج

**اثر وابسته به دوز اتوپوزاید در مهار رشد سلول‌های HepG2:** به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیستی داروی اتوپوزاید بر سلول‌های HepG2، غلظت‌های مختلف دارو (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میکرومولار) در زمان ۴۸ ساعت با سلول‌ها

(۱۳). ترکیب اسید آسپارتیک و توکوفرول یک رویکرد درمانی قانع‌کننده برای مقابله با استرس اکسیداتیو کبد به دلیل مکانیسم‌های اثر مکمل آن‌ها ارائه می‌کند. در حالی که هر ترکیب به‌طور جداگانه اثرات آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی را اعمال می‌کند، تعامل هم‌افزایی آن‌ها به‌طور بالقوه یک استراتژی محافظتی برتر در مقایسه با درمان‌های آنتی‌اکسیدانی فعلی ارائه می‌دهد. با توجه به موارد بیان شده در این مطالعه اثرات هم‌افزایی آسپارتیک اسید و توکوفرول بر سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از اتوپوزاید بر رده سلولی HepG2 به روش MTT و ROS مورد بررسی قرار گرفت.

### روش بررسی

در مطالعه تجربی حاضر، رده سلولی سرطانی کبد (HepG2) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM-HG (Gibco) که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco) و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. پس از آنکه سلول‌ها به ۷۰٪ رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین-EDTA از کف فلاسک جدا شده و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از رسوب سلولی ایجاد شده سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده ماندن سلول‌ها با رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد (۱۴).

**تست سمیت سلولی به روش MTT:** به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه، سوسپانسیون سلولی که حاوی  $10^4$  سلول HepG2 افزوده شد. ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌های سرطانی کبد HepG2، آسپارتیک اسید و آلفا-توکوفرول در غلظت‌های (۲۰۰ و ۴۰۰ و ۱۰۰ و ۵۰ و ۲۵ و ۱۰ میکرومولار) و پس از گذشت ۲۴ ساعت دیگر، داروی اتوپوزاید در غلظت  $IC_{50}$  معادل ۷/۰۸ میکرومولار به سلول‌ها اضافه شدند. پس از ۲۴ ساعت، به هر چاهک پلیت ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه و پلیت به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان مذکور، محلول MTT درون چاهک‌ها خارج شد و ۱۵۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر

مواجه شدند. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، نتایج مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌ها با اتوپوزاید باعث کاهش قابل توجه زیست‌پذیری سلولی به صورت وابسته به دوز شد. در این مطالعه مقدار  $IC_{50}$  داروی اتوپوزاید در رده سلولی HepG2 مواجهه با داروی اتوپوزاید،  $7/08$  میکرومولار تعیین شد و برای ادامه مطالعه این دوز استفاده شد.

**اثر آسپارتیک اسید به همراه اتوپوزاید بر رشد سلول‌های HepG2:** همانطور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، سلول‌های HepG2 مواجهه شده با اتوپوزاید در غلظت  $IC_{50}$  باعث کاهش رشد شده است. با تیمار سلول‌های HepG2 با آسپارتیک اسید در غلظت‌های از پیش تعیین شده، باعث مهار سمیت اتوپوزاید و افزایش رشد سلول‌ها شده است به طوری که این تأثیر وابسته به دوز بوده است. در مقایسه آماری سلول تیمار شده با اتوپوزاید با گروه کنترل مشخص شد که دارای اختلاف معنادار بود ( $P < 0.001$ ). همچنین، در غلظت  $10$  میکرومولار آسپارتیک اسید به همراه اتوپوزاید تفاوت معناداری با گروه اتوپوزاید به تنهایی دیده نشده است ( $P > 0.05$ )، اما تیمار سلول‌ها با آسپارتیک اسید  $25$  میکرومولار به همراه اتوپوزاید باعث افزایش معنادار زنده‌مانی سلول‌ها شد ( $P < 0.01$ ). در ادامه، زنده‌مانی سلول‌هایی که آسپارتیک اسید را در غلظت‌های  $50$ ،  $100$ ،  $200$  و  $400$  میکرومولار دریافت کردند بیشتر از سلول‌های دریافت کننده آسپارتیک اسید  $25$  میکرومولار، به صورت وابسته دوز به افزایش یافت ( $P < 0.001$ ). با این وجود، زنده‌مانی تمامی سلول‌های القای سمیت شده‌ای که آسپارتیک اسید دریافت کردند نسبت به گروه کنترل همچنان کمتر بود ( $P < 0.001$ ).

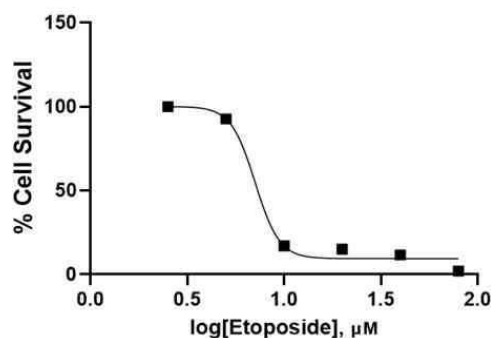
**اثر آلفا-توکوفرول به همراه اتوپوزاید بر رشد سلول‌های HepG2:** براساس نمودار ۳، زنده‌مانی سلول‌های HepG2 تیمار شده با اتوپوزاید به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است ( $P < 0.001$ ). از لحاظ مقایسه آماری زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت‌های  $50$ ،  $100$ ،  $200$  و  $400$  میکرومولار آلفا-توکوفرول به همراه اتوپوزاید دارای اختلاف معنی‌داری با گروه اتوپوزاید بودند ( $P < 0.001$ ) و در غلظت‌های

$10$  و  $25$  میکرومولار به همراه اتوپوزاید تفاوت معنی‌داری با اتوپوزاید به تنهایی دیده نشده است.

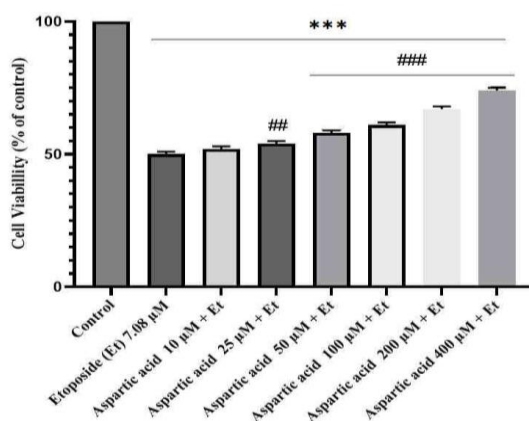
**اثر آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید به همراه اتوپوزاید بر رشد سلول‌های HepG2:** با افزایش غلظت‌های آلفا-توکوفرول + آسپارتیک اسید به همراه اتوپوزاید در نمودار ۴ حیات سلول‌های HepG2 افزایش یافته است. به طوری که در تمامی غلظت‌ها باعث افزایش معنادار زنده‌مانی سلول‌ها شدند بدین شکل که برای غلظت  $10$  میکرومولار اختلاف معناداری ( $p < 0.01$ ) و در سایر غلظت‌ها  $p < 0.001$  نسبت به گروه اتوپوزاید به تنهایی بودند.

**اثر آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید به همراه اتوپوزاید بر سلول‌های HepG2 با بررسی پارامتر ROS:** در نمودار ۵ نشان داده شده است که اتوپوزاید در غلظت  $IC_{50}$  باعث افزایش میزان ROS در سلول‌های کبدی شده است. از طرفی دیگر در تیمار سلول‌ها در غلظت‌های تعیین شده آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید به همراه داروی اتوپوزاید میزان ROS به طور معناداری کاهش پیدا کرده است. از نظر مقایسه آماری در غلظت‌های  $25$ ،  $50$ ،  $100$ ،  $200$  و  $400$  میکرومولار آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید به همراه اتوپوزاید و همچنین در غلظت  $10$  تفاوت معنی‌داری با گروه اتوپوزاید به تنهایی نشان داده است که به ترتیب  $P < 0.001$  و  $P < 0.01$  می‌باشد.

**اثر آلفا-توکوفرول و آسپارتیک اسید به همراه اتوپوزاید بر پراکسیداسیون لیپیدی MDA بر سلول‌های HepG2:** با توجه به نتایج در نمودار ۶، القای سمیت سلولی با استفاده از اتوپوزاید، باعث افزایش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه کنترل شد ( $p < 0.001$ ). تیمار سلول‌ها با استفاده از ترکیب آسپارتیک اسید و توکوفرول در غلظت  $10$ ،  $25$ ،  $50$ ،  $100$  و  $200$  میکرومولار باعث کاهش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه صرفا دریافت کننده اتوپوزاید شد ( $p < 0.01$ ) برای غلظت اول و ( $P < 0.001$ ) برای  $5$  غلظت بعدی. با این وجود سطح مالون‌دی‌آلدئید تمامی گروه‌های تیمار شده با ترکیب آسپارتیک اسید + آلفا توکوفرول به صورت معناداری بیشتر از گروه کنترل بود ( $p < 0.001$ ).

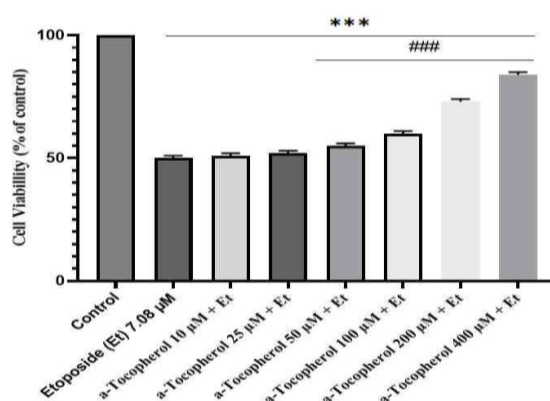


نمودار ۱: سمیت غلظت‌های مختلف اتوپوزاید در سلول‌های HepG2، داده‌ها به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین ارائه شده است.



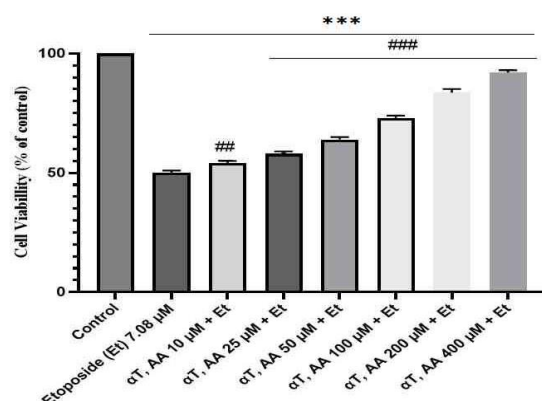
نمودار ۲: اثر غلظت‌های آسپارتیک اسید (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، و ۴۰۰ میکرومولار) به همراه اتوپوزاید در غلظت  $\text{IC}_{50}$  بر رشد سلول‌های HepG2

\*\*\* دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ( $P < 0.001$ ). ### دارای اختلاف معنی‌دار با گروه اتوپوزاید ( $P < 0.001$ ). ## دارای اختلاف معنی‌دار با گروه اتوپوزاید ( $P < 0.01$ )



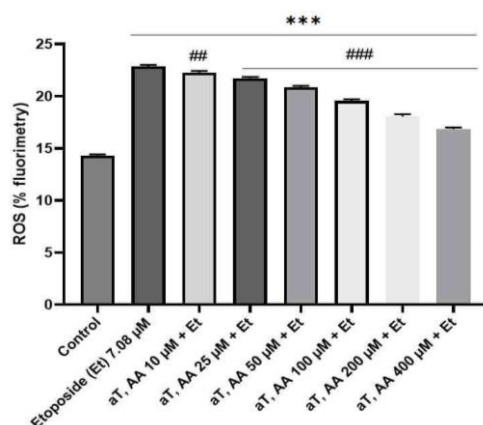
نمودار ۳: اثر غلظت‌های آلفا-توکوفرول (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، و ۴۰۰ میکرومولار) به همراه اتوپوزاید در غلظت  $\text{IC}_{50}$  بر رشد سلول‌های HepG2

\*\*\* دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ( $p < 0.001$ ). ### دارای اختلاف معنی‌دار با گروه اتوپوزاید ( $p < 0.001$ )



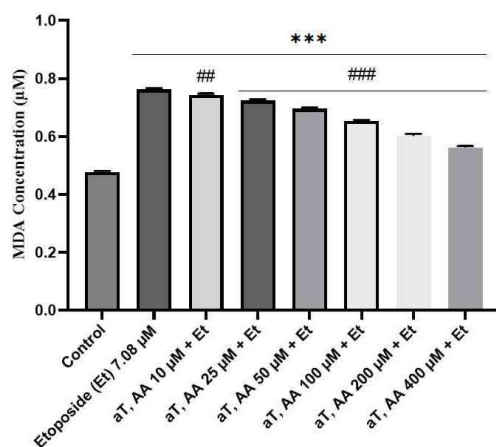
نمودار ۴: اثر غلظت های آلفا-توکوفرول + آسپارتیک اسید (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، و ۴۰۰ میکرومولار) به همراه اتوپوزاید در غلظت IC50 بر رشد سلول های HepG2

\*\*\* دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ( $P<0.001$ ), ### دارای اختلاف معنی دار با گروه اتوپوزاید ( $P<0.001$ ), ## دارای اختلاف معنی دار با گروه اتوپوزاید ( $P<0.01$ )



نمودار ۵: اثر غلظت های آلفا-توکوفرول + آسپارتیک اسید (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، و ۴۰۰ میکرومولار) به همراه اتوپوزاید در غلظت IC50 بر میزان ROS سلول های HepG2

\*\*\* دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ( $P<0.001$ ), ### دارای اختلاف معنی دار با گروه اتوپوزاید ( $P<0.001$ ), ## دارای اختلاف معنی دار با گروه اتوپوزاید ( $P<0.01$ )



نمودار ۶: اثر غلظت های آلفا-توکوفرول + آسپارتیک اسید (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، و ۴۰۰ میکرومولار) به همراه اتوپوزاید در غلظت IC50 بر میزان MDA سلول های HepG2

\*\*\* دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ( $P<0.001$ ), ### دارای اختلاف معنی دار با گروه اتوپوزاید ( $P<0.001$ ), ## دارای اختلاف معنی دار با گروه اتوپوزاید ( $P<0.01$ )



تشکیل رادیکال‌های اکسیژن توسط آنزیم‌هایی مانند گزانتین اکسیداز و NADPH اکسیداز در لکوسیت‌های انسانی جلوگیری می‌کنند. مشخص شد که شلاته آسپارات با مس و یا منگنز فعالیت، آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز را که در مدیریت استرس اکسیداتیو در سلول‌ها حیاتی هستند، تقلید می‌کند (۱۹). Tang و همکاران در سال ۲۰۲۰ با هدف بررسی تاثیر گلوتامات و آسپارات در کاهش استرس اکسیداتیو بافت بیضه/ اپیدیدیم ناشی از تزریق هیدروژن پراکسید در بافت اسکروتوم گراز یک مطالعه انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که مکمل‌های گلوتامات و آسپارات باعث بهبود مورفولوژی بیضه و کاهش شاخص تناسلی در گرازهای تیمار شده با هیدروژن پراکسید شد. تجویز گلوتامات و آسپارات فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد و بر ترشح سیتوکین التهابی بیضه تأثیر گذاشت، اما تأثیری بر سطح هورمون جنسی نداشت (۲۰). در مطالعه Venditti و همکاران در سال ۲۰۲۱ نقش D-Aspartic Acid در مقابله با سمیت ناشی از اتان دی متان سولفونات در بافت بیضه موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که D-Aspartic Acid ممکن است به عنوان یک استراتژی برای کاهش اثرات سمی اعمال شده توسط آلاینده‌های محیطی به منظور حفظ عملکرد تولیدمثلی استفاده شود (۲۱). در سال ۲۰۲۰ Ichikawa و همکاران تاثیر آسپارتیک اسید بر نفروتوکسیسیته مزمن در موش‌های دیابتی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که بهبود آلبومینوری ممکن است ناشی از کاهش استرس اکسیداتیو در کلیه‌ها به دلیل دریافت آسپارتیک اسید باشد که در ادامه، منجر به بهبود لایه سطحی اندوتلیال گلوبرولی شود (۲۲). در مطالعه Rabaca و همکاران در سال ۲۰۲۰ که به ارزیابی تأثیر NAC (N-Acetyl Cysteine) بر حفظ کیفیت اسپرم در طی قرار گرفتن در معرض اتوپوزید به صورت آزمایشگاهی پرداختند مشخص شد که NAC توانست در طول درمان با اتوپوزید در شرایط آزمایشگاهی، یکپارچگی DNA اسپرم را حفظ کند، که نشان می‌دهد NAC ممکن است به عنوان یک عامل کمکی برای حفظ باروری مردان در طول

در مطالعه حاضر، اثرات هم‌افزایی آسپارتیک اسید و توکوفرول بر سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از اتوپوزید بر رده سلولی سرطانی کبد (HepG2) با استفاده از سنجش زنده‌مانی سلولی به روش MTT، اندازه‌گیری سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده از نمودارها، آلفا توکوفرول در غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار نتوانست زنده‌مانی سلول‌ها را افزایش دهد ولی در باقی غلظت‌های مورد آزمایش (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکرومولار) زنده‌مانی سلولی را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. هم‌چنین آسپارتیک اسید نیز در غلظت ۱۰ میکرومولار بر زنده‌مانی سلولی اثری نداشت اما در غلظت‌های (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکرومولار) زنده‌مانی سلولی را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. در حالی‌که ترکیب آسپارتیک اسید + آلفا-توکوفرول در تمامی غلظت‌های آزمایش شده (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکرومولار) باعث افزایش زنده‌مانی سلولی، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و ROS شد. استرس اکسیداتیو، که به عنوان عدم تعادل اکسیداسیون-کاهش به نفع بار اکسیدان تعریف می‌شود، یکی از مهم‌ترین رویدادهای زیستی در پیشرفت سرطان است. سلول‌های سرطانی معمولاً سطح اکسیدان بالاتری دارند که این موضوع یک استراتژی درمانی دوگانه را با تنظیم وضعیت ردوکس پیشنهاد می‌کند (۱۷). اتوپوزید اثرات ضدسرطانی خود را از طریق ایجاد شکست‌های رشته‌ای در DNA با مهار توپوایزومراز II اعمال می‌کند که منجر به آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شود. با وجود استفاده گسترده از این دارو، چالش‌هایی مانند مقاومت دارویی، سمیت و اثربخشی محدود در سرطان، تحقیقات مداومی را در زمینه درمان‌های ترکیبی و فرمولاسیون‌های جدید دارویی به دنبال داشته است (۱۸). مطالعات نشان دادند که اسید آسپارتیک خواص آنتی‌اکسیدانی خود را عمدتاً از طریق از بین بردن رادیکال‌های آزاد و مهار گونه‌های فعال اکسیژن نشان می‌دهد. یک مطالعه قابل توجه اثرات شلات‌های آسپارات با فلزات روی، منیزیم، مس و منگنز را بررسی کرد و نشان داد که این شلات‌ها از

درمان های شیمی درمانی مفید باشد (۲۳). Lee و همکاران در سال ۲۰۲۳ بررسی کردند که اوکراتوکسین به دلیل سمیت بالا و وجود آن در طیف وسیعی از محصولات کشاورزی و محصولات غذایی مشتق شده از آن ها، از جمله غذاها و میان وعده های مخصوص نوزادان و کودکان خردسال، یک نگرانی نوظهور است. در نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده شد آلفا-توکوفرول از طریق کاهش سمیت سلولی و تقویت سیستم های دفاع آنتی اکسیدانی، آسیب کلیوی و استرس اکسیداتیو ناشی از اوکراتوکسین را کاهش داد (۲۴). از این رو مطالعه حاضر هم راستا با مطالعات انجام شده می باشد. هم چنین مطالعات خواص آنتی اکسیدانی آلفا-توکوفرول را در ترکیب با سایر ترکیبات مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که در ترکیب با آنتی اکسیدان های دیگر، اثرات هم افزایی قوی دارد. Wang و همکاران در سال ۲۰۲۰ در یک مطالعه ترکیب آلفا توکوفرول با استرهای گالیک اسید را در امولسیون های روغن در آب بررسی کردند. نتایج نشان داد که آلفا توکوفرول، هنگامی که با پروپیل گالات ترکیب می شود، به طور قابل توجهی ظرفیت آنتی اکسیدانی آن را افزایش می دهد. این مکانیسم بازسازی به آلفا توکوفرول اجازه می دهد تا مدت طولانی تری فعال بماند و اثربخشی آن را در محافظت از لیپیدها در برابر تخریب اکسیداتیو بهبود بخشد (۲۵). در مطالعه حاضر نیز آلفا-توکوفرول به همراه آسپارتیک اسید توانستند سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و گونه های فعال اکسیژن شوند. در یک بررسی Vineetha و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثرات ضد سرطانی ترکیب آلفا-توکوفرول و ال-اسکوربیک اسید را در سمیت سلولی القا شده توسط آرسنیک تری اکسید در سلول های لوسمی رده HL-60 مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ترکیب ال-اسکوربیک اسید و آلفا توکوفرول سمیت سلولی آرسنیک تری اکسید را در سلول های HL-60 تقویت می کند که با تشدید وضعیت اکسیدانی (کاهش GSH، کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز)، پتانسیل غشایی میتوکندری و مهار فاکتور Nrf2 همراه بود (۲۶). از این رو، نتیجه این مطالعه با مطالعه حاضر در یک راستا نبود. Sánchez و همکاران در سال ۲۰۲۲ یک مطالعه به بررسی مکانیسم حفاظتی - $\alpha$ توکوفرول بر روی لیپیدهای غشای سلولی استروسیست های

انسانی تحت فشار پاراکوات پرداختند. استرس ناشی از قرار گرفتن در معرض پاراکوات به طور قابل توجهی باعث کاهش زنده ماندی سلولی و تغییرات لیپید غشایی مانند افزایش گونه های خاصی از سرامیدها که واسطه های لیپیدی مسیرهای آپوپتوز هستند، شد. پیش درمان سلول ها با  $\alpha$ -توکوفرول، این اثرات را کاهش داد، زنده ماندی سلول را افزایش داد و پروفایل لیپیدی را در استروسیست های تیمار شده با پاراکوات تعدیل کرد (۲۷). در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۲۲ به بررسی اثر آلفا-توکوفرول بر اثرات منفی آکريل آمید در یک مدل *in-vivo* پرداختند. برای این منظور جنین مرغ داخل تخم با استفاده از یک نیدل، در معرض آکريل آمید،  $\alpha$ -توکوفرول و ترکیبی از این مواد قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض، نمونه های مغز را جمع آوری کردند و سنجش های بیوشیمیایی را برای بررسی اثر مواد انتخابی بر استرس اکسیداتیو (MDA و گلووتاتیون) را انجام دادند. نتایج نشان داد که غلظت MDA در گروهی که آکريل آمید دریافت کرده بودند به طور معنی داری افزایش یافت، در حالی که در گروه با آلفا توکوفرول، غلظت مشاهده شده در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود. علاوه بر این، کاهش غلظت گلووتاتیون پس از تجویز آکريل آمید مشاهده شد (۲۸). در نتیجه این مطالعه، با مطالعه حاضر در یک راستا بود.

### نتیجه گیری

به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می رسد که ترکیب آسپارتیک اسید + آلفا-توکوفرول باعث بهبود پارامترهای استرس اکسیداتیو و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در رده سلولی (HepG2) مواجهه یافته با اتوپوزاید شد. بهبود پارامترهای استرس اکسیداتیو بستگی به میزان مصرف این ترکیبات دارد.

### سپاس گذاری

این مقاله حاصل پایان نامه خانم مریم تنگستانی زاده برای اخذ درجه دکتری حرفه ای در رشته داروسازی عمومی از دانشگاه علوم پزشکی مازندران- پردیس خودگردان رامسر می باشد.



## مشارکت نویسندگان

دکتر محمد شکرزاده در ارائه ایده، محبوبه رحمتی کوکنده در طراحی مطالعه، مریم تنگستانی زاده در جمع‌آوری داده‌ها، حورالعین عرب و الهه قره خانی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

**حامی مالی:** هزینه‌های توسط معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران- پردیس خودگردان رامسر تامین شد.

**تعارض در منافع:** وجود ندارد.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در «کمیتة اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران» با کد اخلاق IR.MAZUMS.3.REC.1402.18080 به تصویب رسیده است.

## References:

- 1- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** CA Cancer J Clin 2021; 71(3): 209-49.
- 2- Aslani F, Afarin R, Madiseh ND, Nasab HB, Monjezi S, Igder S, et al. **Potentiation of Apoptotic Effect of Combination of Etoposide and Quercetin on Hepg2 Liver Cancer Cells.** Hepatitis Monthly 2023; 23(1): e136194.
- 3- Shah Z, Gohar UF, Jamshed I, Mushtaq A, Mukhtar H, Zia-UI-Haq M, et al. **Podophyllotoxin: History, Recent Advances and Future Prospects.** Biomolecules 2021; 11(4): 603.
- 4- Shokrzadeh M, Ghassemi-Barghi N. **Protective Effect of Amifostine Against Etoposide-Induced Genotoxicity Evaluated by the Comet Assays.** Symbiosis 2018; 25: 28.
- 5- Papież M. **The Effect of Quercetin on Oxidative DNA Damage and Myelosuppression Induced by Etoposide in Bone Marrow Cells of Rats.** Acta Biochim Pol 2014; 61(1): 7-11.
- 6-Fathi-Karkan S, Arshad R, Rahdar A, Ramezani A, Behzadmehr R, Ghotekar S, et al. **Recent Advancements in the Targeted Delivery of Etoposide Nanomedicine for Cancer Therapy: A Comprehensive Review.** Eur J Med Chem 2023; 259: 115676.
- 7-Kluska M, Juszczak M, Żuchowski J, Stochmal A, Woźniak K. **Effect of Kaempferol and Its Glycoside Derivatives on Antioxidant Status of HL-60 Cells Treated With Etoposide.** Molecules 2022; 27(2): 333.
- 8-Qu Y, Tang J, Liu L, Song L, Chen S, Gao Y. **A-Tocopherol Liposome Loaded Chitosan Hydrogel to Suppress Oxidative Stress Injury in Cardiomyocytes.** Int J Biol Macromol 2019; 125: 1192-202.
- 9-Na Y, Woo J, Choi WI, Lee JH, Hong J, Sung D. **A-Tocopherol-Loaded Reactive Oxygen Species-Scavenging Ferrocene Nanocapsules with High Antioxidant Efficacy for Wound Healing.** Int J Pharm 2021; 596: 120205.

- 10- Traber MG, Atkinson J. *Vitamin E, Antioxidant and Nothing More*. Free Radic Biol Med 2007; 43(1): 4-15.
- 11- Wallert M, Ziegler M, Wang X, Maluenda A, Xu X, Yap ML, et al. *A-Tocopherol Preserves Cardiac Function by Reducing Oxidative Stress and Inflammation in Ischemia/Reperfusion Injury*. Redox biology 2019; 26: 101292.
- 12- Cupp MJ, Tracy TS. *Dietary Supplements: Toxicology and Clinical Pharmacology*. New york: Springer Science & Business Media; 2002.
- 13- Satchek JM, Blumberg JB. *Role of Vitamin E and Oxidative Stress in Exercise*. Nutrition 2001; 17(10): 809-14.
- 14- Shokrzadeh M, Motafeghi FS, Lotfizadeh A, Ghorbani M, Haddadi Kohsar A. *Cytotoxicity and Mineralization Activity of Calcium Silicate-Based Root Canal Sealers Compared to Conventional Resin-Based Sealer in Human Gingival Fibroblast Cells*. Int J Dent 2023; 2023: 4376579.
- 15- Rahmati M, Jourablou S, Gharekhani E, Arab H, Shokrzadeh M. *Evaluating the Protective Effects of L-Arginine Against Cisplatin-Induced Cytotoxicity, Genotoxicity, and Oxidative Stress in Normal Kidney Cells and Human Blood Lymphocytes*. J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34(236): 29-41.[Persian]
- 16- Motafeghi F, Gerami M, Mortazavi P, Khayambashi B, Ghassemi-Barghi N, Shokrzadeh M. *Green Synthesis of Silver Nanoparticles, Graphene, and Silver-Graphene Nanocomposite Using Melissa Officinalis Ethanolic Extract: Anticancer Effect on MCF-7 Cell Line*. Iran J Basic Med Sci 2023; 26(1): 57-68.
- 17- Jiang H, Zuo J, Li B, Chen R, Luo K, Xiang X, et al. *Drug-Induced Oxidative Stress in Cancer Treatments: Angel or Devil?* Redox Biol 2023; 63: 102754.
- 18- Jang JY, Kim D, Im E, Kim ND. *Etoposide as a Key Therapeutic Agent in Lung Cancer: Mechanisms, Efficacy, and Emerging Strategies*. Int J Mol Sci 2025; 26(2): 796.
- 19- Sadak MS, Sekara A, Al-Ashkar I, Habib-Ur-Rahman M, Skalicky M, Brestic M, et al. *Exogenous Aspartic Acid Alleviates Salt Stress-Induced Decline in Growth by Enhancing Antioxidants and Compatible Solutes While Reducing Reactive Oxygen Species in Wheat*. Front Plant Sci 2022; 13: 987641.
- 20- Tang W, Wu J, Jin S, He L, Lin Q, Luo F, et al. *Glutamate and Aspartate Alleviate Testicular/Epididymal Oxidative Stress by Supporting Antioxidant Enzymes and Immune Defense Systems in Boars*. Sci China Life Sci 2020; 63(1): 116-24.
- 21- Venditti M, Romano MZ, Aniello F, Minucci S. *Preliminary Investigation on the Ameliorative Role Exerted by D-Aspartic Acid in Counteracting Ethane Dimethane Sulfonate (EDS) Toxicity in the Rat Testis*. Animals 2021; 11(1): 133.
- 22- Ichikawa S, Gohda T, Murakoshi M, Li Z, Adachi E, Koshida T, et al. *Aspartic Acid Supplementation Ameliorates Symptoms of Diabetic Kidney Disease in Mice*. FEBS Open Bio 2020; 10(6): 1122-34.
- 23- Rabaça A, Ferreira C, Bernardino R, Alves M, Oliveira P, Viana P, et al. *Use of Antioxidant Could Ameliorate the Negative Impact of Etoposide on*

- Human Sperm DNA During Chemotherapy*. Reprod Biomed Online 2020; 40(6): 856-66.
- 24- Lee HJ, Kim HD, Ryu D. *Protective Effect of Alpha-Tocopherol Against Ochratoxin a in Kidney Cell Line HK-2*. J Food Prot 2023; 86(5): 100082.
- 25- Wang Y, Wu C, Zhou X, Zhang M, Chen Y, Nie S, et al. *Combined Application of Gallate Ester and A-Tocopherol in Oil-In-Water Emulsion: Their Distribution and Antioxidant Efficiency*. J Dispersion Science and Technology 2020; 41(6): 909-17.
- 26- Vineetha RC, Hariharan S, Jaleel A, Chandran M, Nair RH. *L-Ascorbic Acid and A-Tocopherol Synergistically Triggers Apoptosis Inducing Antileukemic Effects of Arsenic Trioxide Via Oxidative Stress in Human Acute Promyelocytic Leukemia Cells*. Front Oncology 2020; 10: 65.
- 27- Sánchez-Sánchez L, Fernández R, Ganfornina MD, Astigarraga E, Barreda-Gómez G. *Protective Actions of A-Tocopherol on Cell Membrane Lipids of Paraquat-Stressed Human Astrocytes Using Microarray Technology, MALDI-MS and Lipidomic Analysis*. Antioxidants (Basel) 2022; 11(12): 2440.
- 28- Kopańska M, Batoryna M, Banaś-Ząbczyk A, Błajda J, Lis MW. *The Effect of A-Tocopherol on the Reduction of Inflammatory Processes and the Negative Effect of Acrylamide*. Molecules 2022; 27(3): 965.

## Investigating the Synergistic Effects of Aspartic Acid and Tocopherol on Cytotoxicity and Oxidative Stress Caused by Etoposide on Hepg2 Cell Line by MTT and ROS Methods

Mahboube Rahmati Kukandeh<sup>1</sup>, Maryam Tangestanizadeh<sup>2</sup>, Hourolein Arab<sup>3</sup>, Elahe Gharehkhani<sup>1</sup>, Mohammad Shokrzadeh<sup>\*4,5</sup>

### Original Article

**Introduction:** Liver cancer ranks among the deadliest cancers globally. Etoposide, a chemotherapeutic agent frequently utilized in treatment, inhibits topoisomerase II, leading to cell cycle arrest and apoptosis induction. Nonetheless, etoposide generates reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative stress and cellular damage. This study aimed to investigate the combined effects of two antioxidant compounds, alpha-tocopherol and aspartic acid, on cytotoxicity and oxidative stress by etoposide in the HepG2 cell line.

**Methods:** HepG2 cells were pre-exposed to various concentrations of alpha-tocopherol and aspartic acid (10, 25, 50, 100, 200, and 400  $\mu$ M). Following pretreatment, cytotoxicity was induced using etoposide at its IC<sub>50</sub> concentration (7.08  $\mu$ M). Subsequently, lipid peroxidation, ROS concentrations, and cell viability parameters were measured.

**Results:** Based on cell viability measurements and oxidative stress tests, the combination of alpha-tocopherol and aspartic acid with etoposide enhanced cell survival across all tested concentrations. Additionally, they reduced MDA and ROS concentrations.

**Conclusion:** The findings of this study indicate that alpha-tocopherol and aspartic acid can mitigate the cytotoxic effects of etoposide and provide a protective role by enhancing the cellular antioxidant defense. These results highlight the potential use of this combination as a complementary therapeutic strategy in liver cancer treatment.

**Keywords:** Aspartic acid, Alpha-tocopherol, Oxidative stress, MTT assay.

**Citation:** Rahmati kukandeh M, Tangestanizadeh M, Arab H, Gharehkhani E, Shokrzadeh M . **Investigating the Synergistic Effects of Aspartic Acid and Tocopherol on Cytotoxicity and Oxidative Stress Caused by Etoposide on Hepg2 Cell Line by MTT and ROS Methods.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2026; 33(10): 9509-20.

<sup>1</sup>Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup>Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

<sup>3</sup>Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>4</sup>Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup>Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

\*Corresponding author: Tel: 0911263448, email: Mslamuki@gmail.com