

بررسی اثرات دیکلوفناک و ایبوپروفن بر تکثیر سلول های نرمال کلیوی HEK در محیط کشت سلولی

رحیم احمدی^۱، مرتضی سقرجوقی فراهانی^{۲*}، رویا آزادخواه^۳

۱- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران.

۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، اسلامشهر، ایران.

۳- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۴ / پاییز ۹۶ / مسلسل ۷۳

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۶/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۶/۷/۳۰

***مقدمه:** مطالعات نشان می دهند که داروها بر روی سلول های نرمال بدن اثرگذار هستند. هدف اصلی این تحقیق، بررسی اثرات دیکلوفناک و ایبوپروفن بر زنده مانی سلول های نرمال کلیوی HEK در محیط کشت انتخابی بوده است.

***مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی سلول های HEK به طور تصادفی به گروه شاهد و گروه های تحت تاثیر دوزهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر داروهای دیکلوفناک و ایبوپروفن، تقسیم شدند. سپس مقدار اثر سمیت داروها با استفاده از سنجش MTT مورد سنجش قرار گرفت. داده ها با استفاده از روش آماری آزمون واریانس یک طرفه بین گروه ها مقایسه شدند.

***یافته ها:** زنده مانی سلول های HEK در معرض دوزهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ میلی گرم/ میلی لیتر داروی ایبوپروفن در مقایسه با گروه شاهد دچار افزایش غیر معنادار شده است و زنده مانی سلول های HEK در گروه های دریافت کننده دوزهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از داروی دیکلوفناک در مقایسه با گروه شاهد دچار کاهش معنا دار شده است. (به ترتیب $P < 0/01$ ، $P < 0/05$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/01$).

***بحث و نتیجه گیری:** دارو های دیکلوفناک و ایبوپروفن در دوزهای بالا باعث از بین رفتن سلول های HEK می شوند. بنابراین استفاده از این دارو ها در دوزهای بالا نامناسب است.

***واژه های کلیدی:** دیکلوفناک، ایبوپروفن، HEK، زنده مانی.

*آدرس مکاتبه: تهران، میدان ولیعصر، بلوار کشاورز، بیمارستان امام خمینی، مرکز تحقیقات سرطان.

پست الکترونیک: m.farahani@iaups.ac.ir

مقدمه

دیکلوفناک یک داروی ضد التهابی غیر استروئیدی است و با نام تجاری دیکلوفناک عرضه شده است نام شیمیایی آن ۲،۲(۱،۲) Dichloranilino فنیل استیک اسید است. این دارو برای اولین بار توسط الفرد سالمان و ردولف فیستر در سال ۱۹۷۳ سنتز و معرفی شد (۱).

ایبوپروفن یک داروی ضد التهابی غیر استروئیدی است و همانند داروی دیکلوفناک دارای اثرات ضد تب، ضد التهاب، ضد درد می باشد و در درمان آرتريت روماتوئید استفاده می شود (۵-۲).

سلول های HEK یک خط سلولی مشتق شده از سلولهای کلیه جنینی در محیط کشت بافت است. سلول های HEK به راحتی تکثیر می شوند و دارای ترانسفکشن بسیار هستند. سلولهای HEK به طور گسترده ای در تحقیقات زیست شناسی سلولی برای سال های بسیاری استفاده شده است آنها هم چنین با صنعت بیوتکنولوژی برای تولید پروتئین درمانی و ویروس ها برای ژن درمانی استفاده می شود. سلولهای HEK در سال ۱۹۷۳ توسط تغییر محیط کشت از سلولهای طبیعی کلیه جنینی انسان با آدنو ویروس DNA دار در آزمایشگاه Alex van der Ebc و در لیدن هلند تولید شد (۶).

نتایج برخی مطالعات نشان می دهد که، داروهای ضد-التهابی در درمان بیماری های مختلف اثر دارند (۷) و در دیگر پژوهش ها نشان می دهند که افزایش مصرف داروهای ضد التهابی باعث به وجود آمدن زخم پپتیک در دستگاه گوارش می شود (۸).

دارو های ضد التهاب غیر استروئیدی به عنوان کاهش دهنده ی درد جهت تسکین درد و کنترل التهاب استفاده می شود. مطالعات متعدد اپیدمیولوژی، کلینیکی و آزمایشگاهی بر این موضوع اشاره دارند که داروهای ضد التهابی از قبیل ایبوپروفن و دیکلوفناک از پیشرفت و گسترش تعدادی از تومورها جلوگیری می کند. استفاده

طولانی مدت از ایبوپروفن و دیکلوفناک و دیگر داروهای ضد التهابی با کاهش خطر سرطان های پروستات، کولون، پستان و ریه همراه است (۱۰-۹).

مطالعات اخیر نشان می دهند که دیکلوفناک می تواند بر روی سلول های HEK نیز اثر داشته باشد (۱۱). بنابراین هدف اصلی این پژوهش بررسی تکثیر سلول های HEK در معرض دارو های دیکلوفناک و ایبوپروفن از دیدگاه سلولی با بررسی سمیت سلولی می باشد. ایبوپروفن می تواند بر روی متاستاز و تهاجم در سلول های بنیادی سرطان معده تاثیر داشته باشد (۱۲). استفاده از داروی ایبوپروفن در دوز بالا می تواند باعث تفکیک استئوبلاست ها شود اما در دوز پایین این عملکرد را ندارد (۱۳).

بررسی ها نشان می دهند که دیکلوفناک می تواند بر روی سلول های سرطانی اثرگذار باشد (۱۴) و همچنین، مطالعات قبلی نشان می دهند که دارو های ضد التهابی می توانند بر سرکوب تکثیر و القا مرگ سلولی از طریق تغییر در چرخه سلولی و عوامل پیش مرگ سلولی در استئوبلاست انسان نقش داشته باشند (۱۵).

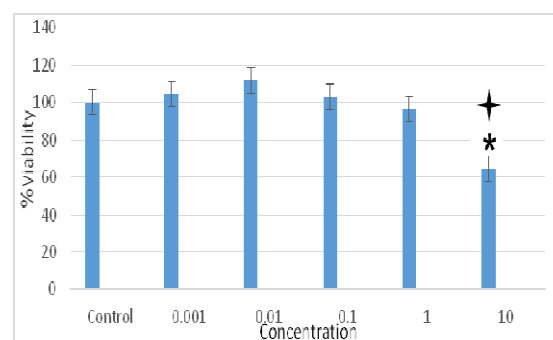
با توجه به گستردگی استفاده از سلول های بنیادی در جهان به خصوص سلول های بنیادی کلیوی و درمان بیماری های مختلف توسط آن (۱۸-۱۶). و نیز با توجه به این که در حوزه اثرات دارو های دیکلوفناک و ایبوپروفن بر روی سلول های نرمال بدن مطالعات بسیاری انجام شده است، این پژوهش به بررسی اثرات دارو های دیکلوفناک و ایبوپروفن بر روی سلول های HEK در محیط کشت انتخابی می پردازد. این مطالعه از دیدگاه سلولی حائز اهمیت بوده و می توان از نتایج مطالعه حاضر برای درمان بیماری ها بهره برد.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی است که در این پژوهش رده سلولی HEK۲۹۳ از انستیتو پاستور خریداری شدند. این سلول ها در تانک نیتروژن در دمای ۱۹۶- درجه

داروی های ضد التهابی می توانند از ابتلا به سرطان جلوگیری کند (۱۹) و همچنین، داروهای ضد التهابی و غیراستروئیدی می تواند بر درمان و پیشگیری تومورهای اپیتلیال اثر گذار باشند (۲۰). مطالعات قبلی موافق با این نتایج نشان می دهند که دارو های ضد التهابی می توانند بر تکثیر، سمیت سلولی و استخوان سازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان نقش داشته باشند (۲۱) همچنین، مطالعات قبلی نشان می دهند که دارو های ضد التهابی می توانند بر سرکوب تکثیر و القا مرگ سلولی از طریق تغییر در چرخه سلولی و عوامل پیش مرگ سلولی در استئوبلاست انسان نقش داشته باشند (۲۲). در راستای این یافته ها، مطالعات قبلی نشان می دهند که داروی دیکلوفناک می تواند بر تکثیر و تمایز سلول های PC۱۲ تاثیر گذار باشد (۲۳). در مقابل، برخی مطالعات نشان می دهند که، استفاده از داروی دیکلوفناک می تواند باعث مهار تکثیر و تمایز سلول های عصبی شود (۲۴). موافق با این یافته، مطالعات قبلی نشان می دهند که، دارو های ضد التهابی از جمله داروی دیکلوفناک می توانند با سرکوب سیگنال های Wnt/ β -catenin/Tcf از رشد سلول های گلیوبلاستوما که نوعی از تومور های مغزی است جلوگیری کند (۲۵) و همچنین، مطالعات قبلی نشان می دهند که داروی دیکلوفناک می تواند رشد سرطان پروستات را مهار کند (۲۶). موافق با این یافته، مطالعات قبلی نشان می دهند که داروی ایبوپروفن، با تعدیل (تغییر) رگ زایی تومور، رشد تومور و متاستاز را در موش کاهش می دهد (۲۷). در این راستا، مطالعات قبلی نشان می دهند که داروهای ایبوپروفن و دیکلوفناک می تواند بر روی سلول های گلیومای انسانی اثر گذار باشند و آنها را مهار کنند (۲۸). هم چنین، مطالعات قبلی نشان می دهند که استفاده از داروی ایبوپروفن می تواند در تکثیر سلول های hESC که سلول های بنیادی جنینی می باشند در درمان آسیب های سلول های قلبی اثر

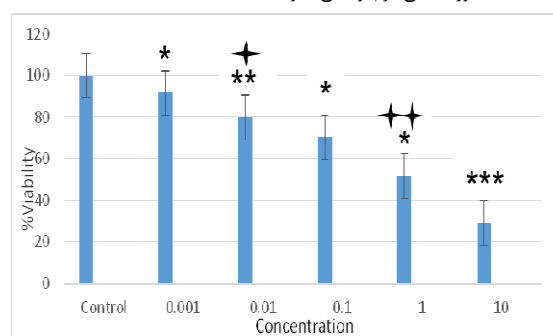
دوز ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر داروی دیکلوفناک، مقایسه بین گروه دریافت کننده دوز ۱ میلی گرم بر میلی لیتر داروی دیکلوفناک با گروه دریافت کننده دوز ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر داروی دیکلوفناک بیانگر عدم تفاوت معنادار بوده است.



نمودار ۱. داده های به دست آمده از جذب نوری تست MTT در دستگاه الایزاریدر بر اساس اثرات غلظت های مختلف داروی ایبوپروفن بر روی سلول های HEK.

* مقایسه با گروه شاهد با $P < 0.01$

مقایسه با دوز ۱ میلی گرم بر میلی لیتر با $P < 0.01$



در MTT داده های به دست آمده از جذب نوری تست. نمودار ۲ دستگاه الایزاریدر بر اساس اثرات غلظت های مختلف داروی HEK دیکلوفناک بر روی سلول های

***, **, * مقایسه با گروه کنترل، به ترتیب با $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.001$

* مقایسه با دوزهای مختلف به ترتیب ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰/۱ میلی

گرم بر میلی لیتر با $P < 0.01$ و $P < 0.05$

بحث و نتیجه گیری

این تحقیق نشان می دهد که داروهای ایبوپروفن و دیکلوفناک در دوز مناسب اثر توکسیسته بر روی رده سلول های HEK دارد، اما در دوز بالا و نامناسب آن باعث تخریب سلول های طبیعی بدن می شود. در راستای این پژوهش، یافته ها نشان می دهد که، استفاده منظم از

دادند که داروی ایبوپروفن در دوزهای کمتر از (۱mg/ml) دارای اثر تکثیری بر لاین سلولی HEK سلول‌های نرمال کلیوی دارد، اما در غلظت (۱۰mg/ml) بر لاین سلولی HEK دارای اثر توکسیسیته بوده است و داروی دیکلوفناک در دوز (۱۰mg/ml) دارای بیشترین اثر توکسیسیته بوده است اما در دوزهای کمتر از (۱۰mg/ml) دارای کمترین اثر توکسیسیته بوده است. بر این مبنای استفاده از داروهای ایبوپروفن و دیکلوفناک در دوزهای پایین باید مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از تمامی افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده اند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

گذار باشند (۲۹). از نظر مکانسیم احتمالی، می‌توان احتمال داد که داروهای ایبوپروفن و دیکلوفناک به دلیل خاصیت ضدالتهابی می‌توانند با اثر بر روی پروتئین NFkappaB اثر گذاشته و باعث تکثیر سلول‌ها شده و در نتیجه باعث رشد سلول‌های بنیادی قلبی شوند (۳۰). این پژوهش به منظور بررسی اثرات دیکلوفناک و ایبوپروفن بر روی تکثیر سلول‌های HEK در محیط کشت انتخابی انجام گرفته است و از دیدگاه مولکولی و ژنوم سلولی دارای محدودیت می‌باشد و همچنین این پژوهش به دلیل کمبود منابع مالی از نظر بررسی در سطح وسیع تر دارای محدودیت بود. محققین این پژوهش امیدوارند در تحقیقات آتی امکان انجام این موضوعات در سطح مولکولی میسر شود. در مجموع نتایج این پژوهش نشان

References

- Altman R, Bosch B, Brune K, Patrignani P, Young C. Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs* 2015; 75: 859-877.
- Moore RA, Derry S, Wiffen PJ, Straube S, Aldington DJ. Comparative efficacy of oral ibuprofen and paracetamol (acetaminophen) across acute and chronic pain conditions. *Eur J Pain* 2015; 19: 1213-1223.
- Jayawardena S, Kellstein D. Antipyretic Efficacy and Safety of Ibuprofen Versus Acetaminophen Suspension in Febrile Children: Results of 2 Randomized, Double-Blind, Single-Dose Studies. *Clin Pediatr (Phila)*. 2016; 56(12):1120 - 1127.
- Wisher, D. (2012). *Martindale: The Complete Drug Reference*. 37th ed. Journal of the Medical Library Association : JMLA, 100(1), 75-76.
- Coceani F, White E, Bodach E, Olley PM. Age-dependent changes in the response of the lamb ductus arteriosus to oxygen and ibuprofen. *Cjpp*. 1979; 57: 825-831.
- Jaluria P, Chu C, Betenbaugh M, Shiloach J. A mini-review of targeting cell engineering using DNA microarrays. *Mol Biotechnol* 2008; 39: 105-111.
- Gersony WM. Diagnosis and management of Kawasaki disease. *JAMA* 1991; 265: 2699-703.
- Shim YK, Kim N. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug and Aspirin-induced Peptic Ulcer Disease. *Korean J Gastroenterol* 2016; 67: 300-312.
- Pountos I, Georgouli T, Bird H, Giannoudis PV. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. *Int J Interferon Cytokine Mediator Res* 2011; 3: 19-27.
- Hung WC. Anti-metastatic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Kaohsiung J Med Sci* 2008; 24: 392-397.
- Koga T, Fujiwara R, Nakajima M, Yokoi T. Toxicological evaluation of acyl glucuronides of nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human embryonic kidney 293 cells stably expressing human UDP-glucuronosyl transferase and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2011; 39: 54-60.
- Akrami H, Mahmoodi F. Ibuprofen inhibits metastasis and invasion of gastric cancer stem cells. *J Sharekord Univ Med Sci*. 2015; 17: 88-96.
- Abukawa H, Phelps M, Jackson P, Smith RM, Vacanti JP, Kaban LB, et al. Effect of ibuprofen on osteoblast differentiation of porcine bone marrow-derived progenitor cells. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 2412-2417.
- Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-diclofenac as an anti-cancer agent. *ECMS* 2016; 10: 610-636.
- Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells. *PLoS One*. 2013; 8(4): e61836.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30.
- Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12617-12621.

18. Atala A, Valle BL, D'Souza T, Becker KG, Wood WH, Zhang Y, et al. Regenerative medicine and urology. *BJU Int* 2003; 92(1): 58-67.
19. Harris RE, Chlebowski RT, Jackson RD, Frid DJ, Ascenseo JL, Anderson G, et al. Breast Cancer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Prospective Results from the Whicr. 2003; 63: 6096-6101.
20. Fecker LF, Stockfleth E, Nindl I, Ulrich C, Forscher T, Eberle J. The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Bjd*. 2007; 156: 25-33.
21. Chang JK, Li CJ, Wu SC, Yeh CH, Chen CH, Fu YC, et al. Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 1371-1382.
22. Chang JK, Li CJ, Liao HJ, Wang CK, Wang GJ, Ho ML. Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology* 2009; 258: 148-156.
23. Rajabalian S, Meymandi MSH, Dabiri SH, Rafat H. Evaluation of effects of diclofenac on the proliferation and differentiation of PC12 cells in vitro. *J Gorgan Uni Med Sci* 2007; 9: 15-21.
24. Kudo C, Kori M, Matsuzaki K, Yamai K, Nakajima A, Shibuya A, et al. Diclofenac inhibits proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 289-295.
25. Sareddy GR, Kesanakurti D, Kirti PB, Babu PP. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and celecoxib attenuates Wnt/ β -catenin/Tcf signaling pathway in human glioblastoma cells. *Neurochem Res* 2013; 38: 2313-2322.
26. Inoue T, Anai S, Onishi S, Miyake M, Tanaka N, Hirayama A, et al. Inhibition of COX-2 expression by topical diclofenac enhanced radiation sensitivity via enhancement of TRAIL in human prostate adenocarcinoma xenograft model. *BMC Urol* 2013; 13: 1-9.
27. Yao M, Zhou W, Sangha S, Albert A, Chang AJ, Liu TC, et al. Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1618-1628.
28. Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, Welz T, Leukel P, Vollmann-Zwerenz A, et al. Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. *PLoS One* 2015; 10: e0140613.
29. Kofidis T, Lebl DR, Swijnenburg RJ, Greeve JM, Klima U, Robbins RC. Allopurinol/uricase and ibuprofen enhance engraftment of cardiomyocyte-enriched human embryonic stem cells and improve cardiac function following myocardial injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29: 50-55.
30. Karakawa A, Fukawa Y, Okazaki M, Takahashi K, Sano T, Amano H, et al. Diclofenac sodium inhibits NFkappaB transcription in osteoclasts. *J Dent Res* 2009; 88: 1042-1047.

The Effects of Diclofenac and Ibuprofen on HEK Cells in Cell Culture

Ahmadi R¹, Sagharjoghi Farahani M^{2*}, Azadkhah R³

1. Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran.

2. Young Researchers and Elite Club, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran, m.farahani@iaups.ac.ir

3. MSc of Genetic, Department of Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Received: 20 Sep 2017 Accepted: 22 Oct 2017

Abstract

Background: The studies show that the Diclofenac and Ibuprofen drugs influence cancer cells proliferation. The main aim of this study was to investigate the effects of Diclofenac and Ibuprofen on the viability of HEK cells in cell culture.

Materials and Methods: In this laboratory experimental study, HEK cells were randomly divided into control group and groups exposed doses to 0.001, 0/01, 0/1, 10, 1 mg/ml of Ibuprofen and Diclofenac. The toxic effect of drugs was measured using the MTT assay method. The data were statistically analyzed between groups using ANOVA.

Results: The viability of HEK cells exposed to 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml of Ibuprofen was not significant increase in compared with control group. And the viability of HEK cells exposed to 1, 10, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml of Diclofenac significantly decreased compared to control group. (Classification $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion: Diclofenac and Ibuprofen in high doses destroy the HEK cells. Therefore, the use of these drugs in high doses is inappropriate.

Keywords: Diclofenac, Ibuprofen, HEK, Viability

***Citation:** 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.