

بررسی اثرات سیترات بر سلول‌های تومور پستانی سگ (CF41-Mg)

رضا وحیدی^۱، علیرضا فارسی‌نژاد^۲، شهاب‌الدین صافی^{۱*}

چکیده

تومورهای غدد پستانی از شایع‌ترین تومورهای سگ‌های ماده بوده که بر اساس طبقه‌بندی‌های پاتولوژیک دارای انواع مختلفی هستند. این تومورها دارای شباهت‌های فراوانی با تومورهای پستانی انسان بوده و بر این اساس می‌تواند به عنوان مدل مناسبی برای مطالعه سرطان‌های پستان در انسان بکار روند. علی‌رغم اثبات اثرات ضد توموری سیترات علیه انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی، اثرات این ترکیب روی سلول‌های تومور غدد پستانی سگ بررسی نشده است. هدف مطالعه حاضر ارزیابی اثرات آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک سیترات روی سلول‌های تومور غدد پستانی سگ (CF41-Mg) با استفاده از آزمون‌های Annexin-PI و MTT (احیای آنزیمی ترازول زرد رنگ به فورمازان ارغوانی در سلول‌های زنده) می‌باشد. نتایج آزمون MTT، مهار وابسته به دوز تکثیر سلول‌های CF41-Mg توسط سیترات و مهار ۵۰ درصدی بقای سلول‌ها را در غلظت ۲۶ میلی مولار از سیترات، نشان داد. به علاوه درصد سلول‌های دچار آپوپتوز پس از تماس ۴۸ ساعته سلول‌ها با غلظت IC₅₀ (مهار ۵۰ درصدی بقای سلولی) سیترات (۲۶ میلی مولار)، به طور معنی داری افزایش یافت (P < ۰/۰۰۱). بر اساس نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد سیترات می‌تواند به عنوان یک درمان کمکی مناسب، همراه با سایر ترکیبات مورد استفاده در درمان سرطان غدد پستانی سگ استفاده گردد.

واژگان کلیدی: سیترات، آپوپتوز، تومور غدد پستانی سگ

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۳

مقدمه

تومورهای غدد پستانی از شایع‌ترین تومورهای سگ‌های ماده بوده که بر اساس طبقه‌بندی‌های پاتولوژیک دارای انواع مختلفی هستند (۱۴). این تومورها دارای شباهت‌های فراوانی با تومورهای پستانی انسان بوده و بر این اساس می‌تواند به عنوان مدل مناسبی برای مطالعه سرطان‌های پستان در انسان بکار روند (۱۰). یکی از رده‌های سلولی تومور پستانی سگ، رده Mg-CF41 می‌باشد. سلول‌های این رده با دارا بودن خصوصیتی مثل فقدان بیان آنزیم سیکلواکسیژناز^۲، کاهش بیان E-cadherin و افزایش بیان Vimentin می‌تواند یکی از مدل‌های مناسب برای مطالعه تومورهای پستانی انسان باشند (۱۱). هزینه زیاد

درمان‌های ضد توموری رایج، مقاومت به داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی و عوارض جانبی آنها اهمیت شناسایی ترکیبات درمانی جدید را دو چندان می‌کنند.

از آنجا که سلول‌های سرطانی علاوه بر تولید مداوم آدنوزین تری فسفات، مقادیر فراوانی از کوفاکتورها، لیپیدها، گلوکز و آمینواسیدها را مصرف می‌کنند، به نظر می‌آید مداخله در روند متابولیسم سلول‌های سرطانی می‌تواند یکی از راهکارهای درمانی موثر به حساب آید (۲ و ۳، ۶ و ۷). از جمله ترکیباتی که بر متابولیسم سلول‌های سرطانی اثرات متنوعی دارد، سیترات می‌باشد (۹ و ۷، ۶). این ترکیب سبب مهار گلیکولیز، افزایش تولید گلوکز و لیپیدها، مهار چرخه کربس و تخلیه انرژی سلولی شده و از این طریق می‌تواند علاوه بر کند شدن یا توقف تکثیر سلول‌های سرطانی، با مکانیسم‌های آپوپتوز و یا نکروز سبب مرگ این سلول‌ها نیز شود (۸). با این وجود مشخص شده است که اثرات ضد توموری سیترات بسته به نوع سلول‌های مورد مطالعه متفاوت است (۶). از آنجایی که تا به امروز مطالعه‌ای روی اثرات این ترکیب علیه سرطان‌های سگ انجام نشده است، بنابراین در مطالعه حاضر برآن شدیم تا اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک سیترات را بر روی سلول‌های رده CF41-Mg بررسی نماییم.

مواد و روش کار

- رده سلولی

سلول‌های سرطان پستان سگ CF41-Mg (CRL-6232TM) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

- کشت سلول

سلول‌های CF41-Mg در محیط (Gibco, USA) medium Dulbecco's modified Eagle's همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاو

* ۱- گروه پاتولوژی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. safishahab@yahoo.com

۲- مرکز تحقیقات پاتولوژی و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

داده شد. پس از چسبیدن سلول‌ها به اسلاید، با کمک الکل - استون سلول‌ها در محل خود ثابت شدند. در نهایت با استفاده از رنگ‌های هماتوکسیلین و اتوزین سلول‌ها رنگ آمیزی شده و ریخت‌شناسی آنها با میکروسکوپ نوری (Germany) DM Leica ۵۵۰۰ بررسی گردید.

هم‌زمان با بررسی ریخت‌شناسی نرمال سلول‌های CF۱-Mg، این سلول‌ها به تعداد مساوی به چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه گردیدند. پس از انکوباسیون ۱۲ ساعته، غلظت‌های مورد مطالعه سیترات به چاهک ها اضافه و پلیت به انکوباتور منتقل گردید. ۴۸ ساعت بعد، تغییرات ظاهری سلول‌ها بوسیله میکروسکوپ فاز کنتراست (Hong Kong, China) MotiC AE ۳۱ Elite مورد ارزیابی قرار گرفت.

- تعیین درصد بقای سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT

اساس این آزمون بر احیای آنزیمی تترازولیوم diphenyltetrazolium bromide ۵- و ۲-(۱-yl)-۲-thiazolomethyl di (۵- و ۳- به فورمازان (Formazan) بوسیله میتوکندری سلول‌های زنده می‌باشد (۵). برای انجام آن سلول‌ها با چگالی $7 \times 10^3 \text{ cells}/200 \mu\text{l}$ در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت رویی حذف و $200 \mu\text{l}$ محیط کشت جدید حاوی غلظت‌های (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی مولار) از سیترات جایگزین گردید (۵ چاهک برای هر غلظت در نظر گرفته شد). پس از ۴۸ ساعت محیط کشت حاوی ترکیبات مورد مطالعه حذف و درصد بقای سلول‌ها بوسیله کیت MTT assay (Sigma, USA) مورد بررسی قرار گرفت.

به طور خلاصه به هر چاهک $100 \mu\text{l}$ محلول MTT (mg/ml) ۵ اضافه و پس از گذشت ۴ ساعت از انکوباسیون پلیت، مایع رویی تخلیه شده و مقدار $100 \mu\text{l}$ از دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide) به چاهک ها اضافه گردید (DMSO) با نفوذپذیر کردن غشای سلولی و انحلال فورمازان در خود باعث پخش شدن رنگ ارغوانی در چاهک می‌شود). پس از چندین بار تکان دادن پلیت جهت پخش رنگ

(Gibco, USA)، 60 IU mL^{-1} پنیسیلین G، $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ استرپتومایسین و $1/5 \mu\text{g mL}^{-1}$ آموتریسین (Sigma, USA) به صورت تک لایه کشت داده و در انکوباتور با دمای 37°C و غلظت ۵٪ دی اکسید کربن نگهداری شدند. جهت حفظ رشد تصاعدی سلول‌ها، محیط کشت هر ۲ روز یکبار تعویض گردید و پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۸۰ تا ۹۰ درصد، سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند. با توجه به تعداد اولیه سلول‌های کشت داده شده (CountessTM automated cell counter, Invitrogen, USA)، روند رشد سلول‌ها، مساحت فلاسک مورد استفاده و شمارش متوالی سلول‌ها، تراکم سلولی تعیین می‌گردید. جهت پاساژ از آنزیم TrypLE SelectTM (Gibco, USA) استفاده گردید. برای این منظور سلول‌ها با PBS (سالین بافر شده با فسفات) شسته شده (۲ بار) و آنزیم به آنها اضافه گردید. پس از انکوباسیون ۱۰ دقیقه‌ای در انکوباتور و جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، سرم جنینی گاو به فلاسک اضافه (جهت خشتی شدن آنزیم) و سوسپانسیون حاصله به فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل شد. متعاقب سانتریفوژ سلول‌ها با دور 1200 rpm به مدت ۵ دقیقه، مایع رویی حذف و ۱ میلی لیتر محیط کشت به پلت سلولی اضافه گردید. سوسپانسیون سلولی حاصل به فلاسک های جدید انتقال یافت.

- تیمار سلول‌ها

محلول استوک سیترات سدیم تری بیسیک (Merck Millipore Corporation, Germany) با غلظت ۱ مولار تهیه گردید (از آب مقطر به عنوان حلال استفاده شد). در ادامه با استفاده از محیط کشت غلظت‌های مورد نیاز سیترات (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی مولار) بدست آمد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در تماس با این غلظت‌ها قرار گرفتند. گروه کنترل فقط دارای آب مقطر بود. پس از تعیین غلظت ۲۶ میلی مولار به عنوان غلظت IC_{50} این غلظت نیز بوسیله محیط کشت تهیه گردید.

- بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها

جهت ارزیابی ریخت‌شناسی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، تعداد کافی از سلول‌ها بر روی اسلایدهای سیالینیزه قرار

شدند. در مرحله بعد سلول‌ها در Binding buffer معلق و سپس یدید پروپیدیوم (PI) و Annexin V به آنها اضافه شد. این سوسپانسیون به آرامی ورتکس شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید. در این مرحله پس از حذف Binding buffer، Annexin V و PI، مجدداً Binding buffer به هر تیوب اضافه شده و سلول‌ها بوسیله دستگاه فلوئوسیتومتری (BD FACSCalibur) (Biosciences, USA) مورد بررسی قرار گرفتند.

- آنالیز آماری

تفاوت آماری بین گروه‌های کنترل و آزمایش بوسیله آزمون‌های Student's t-test, One-way analysis of variance (ANOVA) و نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی‌داری اختلافات آماری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

ریخت‌شناسی سلول‌های CF41-Mg

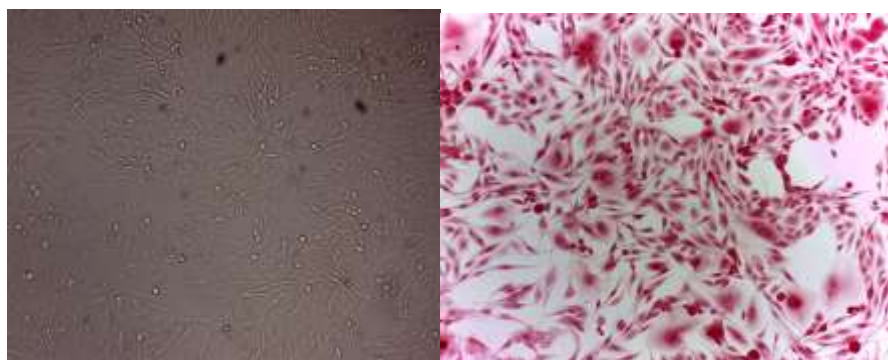
سلول‌های CF41-Mg ریخت‌شناسی شبه مزانشیم را نشان دادند. این سلول‌ها به صورت دوکی شکل و بزرگ بود و برخی ویژگی‌های بدخیمی مثل وجود سلول‌های چند هسته‌ای، حضور چندین هستک بزرگ و افزایش نسبت هسته به سیتوپلاسم را نشان دادند (نگاره ۱).

ارغوانی در چاهک‌ها، جذب نوری چاهک‌ها بوسیله دستگاه الیزا ریدر (ELX 808) (BIOTek, USA) در طول موج ۴۹۰ nm خوانده شد. متعاقب محاسبه میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف سیترات، این مقادیر را بر میانگین جذب نوری گروه کنترل تقسیم کرده و اعداد حاصل در عدد ۱۰۰ ضرب شد. اعداد بدست آمده در واقع درصد زنده مانی سلول‌ها پس از تجویز غلظت‌های مختلف سیترات می‌باشند. با استفاده از درصد‌های بدست آمده منحنی دوز- پاسخ را رسم نموده و غلظت مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصدی بقای سلولی (IC_{50}) از روی نمودار بدست آمد.

- سنجش میزان آپوپتوز سلولی

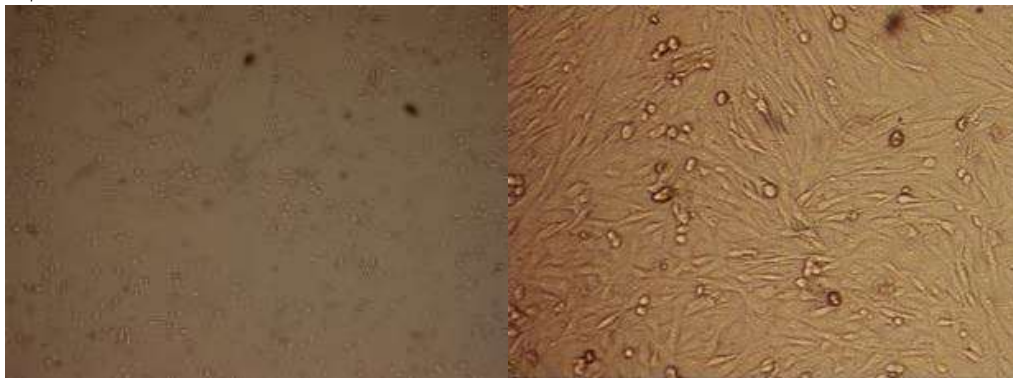
ارزیابی کمی میزان فسفاتیدیل سرین منتقل شده به سطح سلول‌های در حال آپوپتوز بوسیله کیت ApoFlowEx[®] FITC (ExBio Company, Czech Republic) انجام شد. اساس کار این کیت بر اتصال Annexin V به فسفاتیدیل سرینی می‌باشد که از لایه داخلی به لایه خارجی غشای سلول‌های در حال آپوپتوز منتقل شده است (۱۳ و ۱۴).

سلول‌ها در فلاسک 25 cm^2 کشت داده شدند. پس از رسیدن تراکم آنها به ۸۰ تا ۹۰ درصد، محیط کشت تخلیه و با محیط جدید حاوی غلظت IC_{50} سیترات جایگزین گردید. یک فلاسک نیز برای بررسی میزان القای آپوپتوز توسط آب مقطر به عنوان حلال در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها از کف فلاسک‌ها کنده و در Ice cold PBS شسته

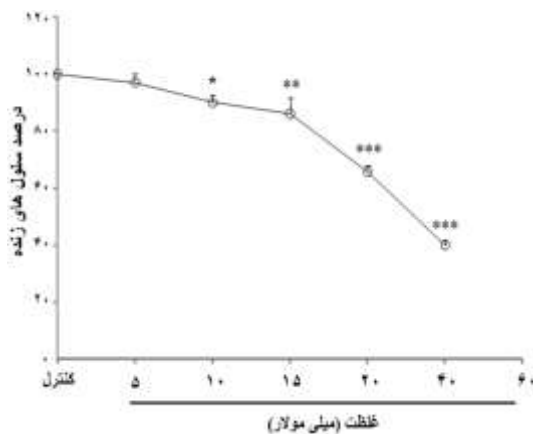


نگاره ۱- ریخت‌شناسی سلول‌های CF41-Mg با میکروسکوپ نوری (تصویر سمت چپ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، $100\times$) و میکروسکوپ

معکوس (تصویر سمت راست، $100\times$)



نگاره ۲- ریخت شناسی سلول‌های CF41-Mg در گروه‌های کنترل (آب مقطر، ۱) و تیمار (غلظت ۲۶ میلی مولار سیترات، ۲)



نمودار ۲- نمودار دوز-پاسخ مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف سیترات

بر بقای سلول‌های CF41-Mg.

***P<۰/۰۰۱, **P<۰/۰۱, *P<۰/۰۵

القای آپوپتوز در سلول‌های CF41-Mg به دنبال تجویز

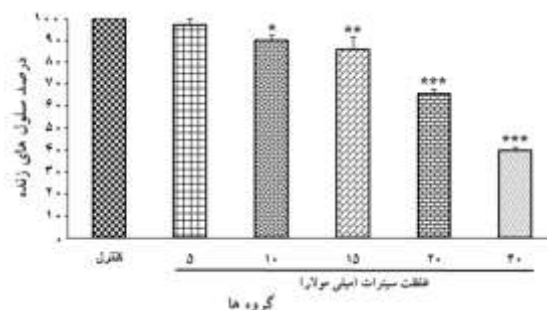
غلظت IC₅₀ سیترات

۴۸ ساعت پس از تجویز غلظت ۲۶ میلی مولار از سیترات به سلول‌های تومور پستانی سگ، درصد سلول‌های دچار آپوپتوز با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری و روش Annexin-PI تعیین گردید. همانگونه که در نگاره ۳ و نمودار ۳ مشخص است، غلظت IC₅₀ سیترات می‌تواند علاوه بر کاهش درصد سلول‌های زنده، سبب افزایش معنی دار درصد سلول‌های دچار آپوپتوز (مجموع آپوپتوز زودرس و دیررس) نیز شود (P/۰۰۱). بررسی‌های ریخت‌شناختی سلول‌ها نیز القای آپوپتوز در سلول‌های مورد مطالعه را نشان

در نگاره ۲، نیز تغییرات ریخت شناسی سلول‌های مورد مطالعه پس از اضافه کردن حلال (گروه کنترل) و سیترات (گروه تیمار) ارائه شده است. همانگونه که مشخص است انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌ها با غلظت ۲۶ میلی مولار سیترات سبب چروکیدگی سیتوپلاسم و کروی شدن سلول‌ها می‌گردد.

اثرات ضد تکثیری سیترات روی سلول‌های CF41-Mg

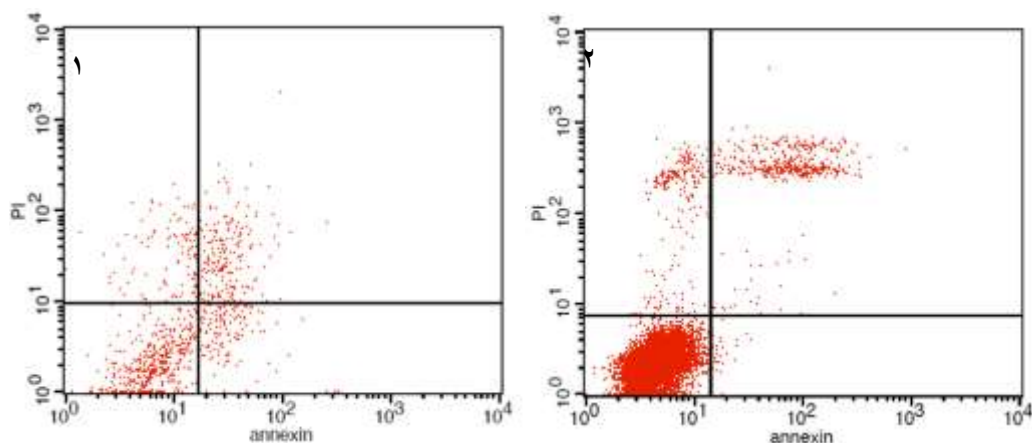
متعاقب تماس ۴۸ ساعته سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۴۰ میلی مولار از سیترات، میانگین درصد بقای سلول‌ها به ترتیب ۹۶/۹۷±۳/۲۶، ۹۰/۰۲±۲/۶۶، ۸۶/۰۴±۵/۵۸، ۶۵/۷۵±۲/۱۹ و ۳۹/۹۹±۱/۴۲ بدست آمد. با توجه به نمودار ۱ و ۲ سیترات به صورت وابسته به دوز سبب مهار تکثیر سلول‌های CF41-Mg گردید. غلظت ۲۶ میلی مولار به عنوان غلظت IC₅₀ تعیین شد.



نمودار ۱- درصد بقای سلول‌های CF41-Mg پس از تماس با سیترات و انجام آزمون MTT. اختلاف آماری در مقایسه با گروه کنترل به صورت ***P<۰/۰۰۱, **P<۰/۰۱, *P<۰/۰۵ نشان داده شده است.

سلول‌ها و ایجاد سلول‌هایی کروی با سیتوپلاسم چروکیده اشاره کرد (نگاره ۲).

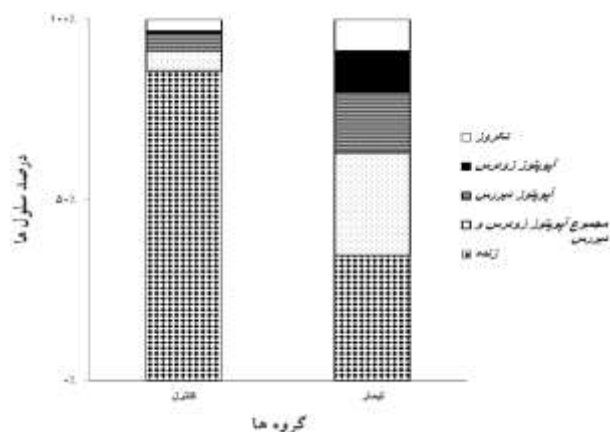
می‌دادند. از مهمترین تغییرات سلول‌ها پس از تجویز غلظت IC₅₀ سیترات می‌توان به از دست رفتن ریخت‌شناسی طبیعی



نگاره ۳- نمودارهای فلوسیتومتری گروه‌های تیمار (غلظت ۲۶ میلی مولار سیترات، ۲) و کنترل (آب مقطر، ۱)

Saito و همکاران این سلول‌ها سطوح اندکی از E-cadherin و مقادیر فراوانی از Vimentin و N-cadherin را بیان کرده و دارای فنوتیپ شبه مزانشیم هستند (۱۱). از دست دادن ویژگی‌های اپی تلیالی (از دست دادن اتصال سلول به سلول و کاهش بیان E-cadherin) و بیان ژن‌های مزانشیمی مثل Vimentin و N-cadherin از ویژگی‌های پدیده Epithelial-Mesenchymal transition می‌باشند. این روند (EMT) با افزایش متاستاز و مقاومت به داروهای ضد سرطانی مرتبط می‌باشد (۱۱). بنابراین شناسایی ترکیبات دارویی ای که بتوانند سبب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی‌ای با این ویژگی شوند، بسیار مهم و کاربردی است. بررسی‌های ریخت‌شناسی انجام گرفته در مطالعه حاضر نیز ظاهر دوکی شکل این سلول‌ها را نشان داد.

مطالعات گذشته، اثرات ضدتوموری سیترات را علیه سرطان‌های مختلف مثل سرطان مثانه و معده نشان داده‌اند (۱۵ و ۹، ۷). ماهیت مرگ سلولی و دوز موثر سیترات در این مطالعات با هم و با مطالعه حاضر متفاوت می‌باشد. اختلاف در رده سلولی مورد مطالعه می‌تواند علت این تفاوت باشد. با این وجود اطلاعاتی در مورد عملکرد این ترکیب روی سلول‌های



نمودار ۳- آنالیز آماری نتایج بدست آمده از فلوسیتومتری

بحث

تومورهای غده پستانی در سگ‌ها شایع بوده و از عوامل خطر آن می‌توان به سن، تغییرات هورمونی، نژاد و حساسیت ژنتیکی اشاره کرد (۱۴). به لحاظ آسیب‌شناسی، تقریباً ۵۰ درصد این تومورها بدخیم بوده و عمدتاً به واسطه متاستاز و یا عود مجدد سبب مرگ و میر در این حیوانات می‌شوند (۱۴). یکی از رده‌های سلولی سرطان پستان در سگ که چندان مورد بررسی قرار نگرفته، رده سلولی CF41-Mg می‌باشد. طبق بررسی‌های

جهت تکثیر و ساخت سلول‌های جدید سنتز می‌کنند. از طرف دیگر این سلول‌ها مقادیر فراوان گلوکز، آمینو اسید و لیپیدها را مصرف می‌کنند (۸ و ۶). سیترات یک حسگر مهم سطح انرژی و یک ترکیب واسطه مهم در مسیرهای متابولیک می‌باشد. این ماده از طریق تحریک فرآیند استیلاسیون هیستون (Histone acetylation)، نقش عمده ای در تعیین سطح تعدادی از آنزیم‌های تنظیمی کلیدی ایفا می‌کند (۶). سیترات فعالیت ضد سرطانی خود را به دو صورت انجام می‌دهد، روند وابسته به انرژی و روند مستقل از انرژی. در نوع وابسته به انرژی سیترات از طریق مهار بتا-اکسیداسیون، مهار آنزیم‌های فسفوفروکتوکیناز ۱ و ۲، پیرووات کیناز، هگزوکیناز و آنزیم ارتباطی مسیر گلیکولیز و چرخه کربس یعنی پیرووات دهیدروژناز سبب مهار شدید مسیر گلیکولیز و چرخه کربس شده و در نهایت تولید انرژی سلول به شدت کاهش می‌یابد. از سوی دیگر سیترات با تحریک سنتز اسیدهای چرب و فرآیند نوگلوکوژنز، مصرف آدنوزین تری فسفات و NADPH را افزایش می‌دهد. این اتفاقات در مجموع می‌توانند به سرعت سبب تخلیه انرژی داخل سلولی، توقف رشد سلول و مرگ آن شوند (۸ و ۶). مکانیسم های احتمالی برای اثرات مستقل از انرژی سیترات شامل کاهش بیان ۱-Mcl (یک پروتئین ضد آپوپتوزی) و تحریک شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشند (۶).

Icard و همکاران در سال ۲۰۱۱ دو رده سلولی سرطان معده انسان را با غلظت‌های ۲۰-۵ میلی مولار سیترات مواجه کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که سیترات منجر به مرگ آپوپتوتیک سلولی، از طریق فعال شدن کاسپاز ۹ و مسیر میتوکندریایی، به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود (۶). این نتایج فعالیت ضد سرطانی سیترات را که در گذشته در رده سلولی مزوتلیوم انسان (MSTO-۲۱۱H) دیده شده بود را تأیید میکرد (۱۵). البته حساسیت سلول‌های سرطان معده بیشتر از سلول‌های MSTO-۲۱۱H بود. مکانیسم پیشنهادی آنها برای القای آپوپتوز توسط سیترات، مهار Bcl-xl و کاهش بیان ۱-Mcl می‌باشد (۶). نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با اطلاعات مطالعات قبلی

سرطان پستان سگ وجود ندارد. بنابراین در مطالعه حاضر ابتدا تأثیر غلظت‌های مختلف سیترات روی تکثیر سلول‌های سرطان پستان سگ (CF41-Mg) بررسی و در ادامه میزان القای آپوپتوز توسط غلظت ۵۰ IC این ترکیب ارزیابی گردید. بر اساس نتایج آزمون MTT (نمودارهای ۱ و ۲)، سیترات به صورت وابسته به دوز سبب متوقف کردن تکثیر سلول‌های سرطانی شده و غلظت ۲۶ میلی مولار از آن سبب مهار ۵۰ درصدی بقای سلول‌های CF41-Mg می‌گردد. نگاره شماره ۲ تغییرات ریخت شناسی ایجاد شده در سلول‌های سرطانی را ۴۸ ساعت پس از تماس با سیترات به نمایش می‌گذارد. همان طور که مشخص است، سلول‌های گروه تیمار در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل تغییراتی مثل گرد شدن، از دست دادن یکنواختی و چروکیدگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهند. اثرات سیترات بر روی سلول‌های سرطانی بسته به حساسیت رده سلولی مورد مطالعه و میزان تخلیه انرژی متفاوت می‌باشد (۸ و ۶). به گونه ای که در برخی رده‌های سلولی سبب القای آپوپتوز و در برخی دیگر سبب ایجاد نکروز می‌شود. از دیگر نتایج مطالعه حاضر مشارکت قابل توجه آپوپتوز در سمیت‌زایی سیترات می‌باشد. همانگونه که در نمودار ۳ نشان داده شده، این ترکیب ضمن کاهش میزان سلول‌های زنده سبب افزایش معنی‌دار درصد سلول‌های دچار آپوپتوز زودرس و دیررس می‌گردد (۰/۰۰۱ < P). افزایش درصد آپوپتوز زودرس حاکی از وجود سلول‌هایی در وضعیت ایستا (Static) و غیرتکثیری و افزایش درصد آپوپتوز دیررس پیشنهاد دهنده حضور سلول‌هایی در مراحل انتهایی آپوپتوز و مرگ قریب الوقوع سلول‌ها می‌باشد (۴ و ۱). افزایش همزمان درصد سلول‌های دچار آپوپتوز زودرس و دیررس، پس از تماس سلول‌های تومور پستانی با سیترات، نشان دهنده مشارکت آپوپتوز در ایجاد حداقل برخی از اثرات این ترکیب می‌باشد.

سلول‌های سرطانی مقادیر فراوانی از ماکرومولکول‌ها، لیپیدها، انرژی و کوفاکتورهای مختلف مثل NAD^+ ، NADPH و H^+ را

- Icard, P. (2011): Citrate induces apoptotic cell death: a promising way to treat gastric carcinoma? *Anticancer Res.* 31(3): 797-805.
10. Queiroga, F.L., Raposo, T., Carvalho, M.I., Prada, J., and Pires, I. (2011): Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo.* 25(3): 455-465.
11. Saito, T., Dai, T., and Asano, R. (2013): The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells. *Oncol Lett.* 5(3): 1068-1074.
12. Vander Heiden, M.G. (2011): Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 10(9): 671-684.
13. Van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. (1998): Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 31(1): 1-9.
14. Withrow, S.J., Vail, D.M., and Page, R. (2013): Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology, 5th edition. Elsevier Health Sciences: Maryland Heights; 538-556.
15. Zhang, X., Varin, E., Allouche, S., Lu, Y., Poulain, L., and Icard, P. (2009): Effect of citrate on malignant pleural mesothelioma cells: a synergistic effect with cisplatin. *Anticancer Res.* 29(4): 1249-1254.

هم‌خوانی داشته و به حساسیت سلول‌های تومور غدد پستانی سگ نسبت به سیترات اشاره دارد. بنابراین به نظر می‌آید می‌توان از سیترات جهت درمان و کاهش بار توموری سرطان‌های پستان سگ استفاده کرد. مطالعه بر روی مدل‌های حیوانی، در صورت انجام، می‌تواند این فرضیه را تأیید یا رد کنند.

فهرست منابع

1. Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., and Irimie, A. (2009): Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol.* 48(6): 811-821.
2. Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011): Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 11(2): 85-95.
3. Deberardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., and Thompson, C.B. (2008): Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev.* 18(1): 54-61.
4. Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495-516.
5. Freshney, R.I. (2010): Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications 6th edition. Wiley-Blackwell, New Jersey. P: 365-376.
6. Icard, P., Poulain, L., and Lincet, H. (2012): Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1825(1): 111-116.
7. Kruspig, B., Nilchian, A., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2012): Citrate kills tumor cells through activation of apical caspases. *Cell Mol Life Sci.* 69(24): 4229-4237.
8. Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kühnle, S., and Nicotera, P. (1997): Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 185(8): 1481-1486.
9. Lu, Y., Zhang, X., Zhang, H., Lan, J., Huang, G., Varin, E., Lincet, H., Poulain, L., and

