مقایسهٔ پروفایل متابولوم سلول‌های اپیتلیال حساس و مقاوم به داروی سیس‌پلاتین سرطان تخمدان به کمک روش اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (^{1}H-NMR)

زیبا اکبری [۱،۳](M.Sc)، علی اوسط ملتی [۱](Ph.D)، امیر امانزاده [۲](Ph.D) ، ابوالفضل نظریان [۱](Ph.D)، زهرا زمانی [۳](Ph.D)، محمد ارجمند [*۳](Ph.D)

۱- *مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران*

۲- *بانک سلولی انستیتوپاستور ایران، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران*

۳- *بخش بیوشیمی انستیتوپاستور ایران، انستیتو پاستورایران، تهران، ایران*

چکیده

سابقه و هدف: سرطان اپیتلیال تخمدان یکی از کشنده‌ترین بدخیمی ژنیکولوژیک زنان و عامل بیش از ٪۸۵ از سرطان‌های تخمدان است. شیمی‌درمانی انتخابی این بیماری، داروی سیس‌پلاتین می‌باشد. با این حال، استفاده طولانی‌مدت این دارو غالباً با بروز مقاومت دارویی همراه شده است. متابولومیکس یک تکنیک با کارآیی بالا است که می‌تواند در پایش رشد تومور مورد استفاده قرار گیرد. تکنیک ^{1}H-NMR یک روش غیرتهاجمی، در علم متابولومیکس می‌باشد. مطالعه کنونی، به منظور شناسایی تغییرات متابولیتی و مسیرهای بیوشیمیایی بافت اپیتلیال سرطانی تخمدان و نیز شناسایی بیش‌تر مکانیسم‌های دخیل در روند مقاومت دارویی سیس پلاتین صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: رده‌های سلولی A2780S و A2780CP کشت داده شدند. استخراج متابولیت‌های سلولی با روش متانول- کلروفرم- آب صورت گرفت و طیف سنجی نمونه‌ها با دستگاه NMR ۴۰۰ مگاهرتز صورت گرفت. پس از پردازش اولیه و نهایی داده‌ها و مراجعه به پایگاه داده متابولوم انسانی و متابوآنالیست، تغییرات مسیرهای بیوشیمیایی و متابولیت‌های مربوط به آن‌ها شناسایی شدند.

یافته‌ها: مهم‌ترین متابولیت‌های تغییریافته در این بررسی شامل فوکوز، سوربیتول، مانیتول، مانوز، رامنوز، گلیسرول، گالاکتونیت، آلفا لاکتوز، میواینوزیتول و ملیبیوز بودند. آنالیز مسیرهای بیوشیمی نیز نشان داد که مسیرهای متابولیسم گالاکتوز، فروکتوز و مانوز به طور معناداری جزء مهم‌ترین مسیرهای بیوشیمیایی متفاوت میان سلول‌های سرطانی حساس و مقاوم به داروی سیس‌پلاتین تخمدان بوده‌اند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از بررسی ما نشان داد که مقاومت به سیس‌پلاتین عمدتاً ناشی از تغییر مسیرهای کربوهیدراتی و متابولیت‌های مربوط به آن‌ها بوده است.

واژه‌های کلیدی: سرطان تخمدان، متابولومیکس، سیس‌پلاتین، مقاومت دارویی، ^{1}H-NMR

مقدمه

در میان تومورهای توده‌ای ژنیکولوژیک، سرطان تخمدان جزء کشنده‌ترین بدخیمی‌ها محسوب می‌شود. این بیماری به

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۶۴۰۲۷۷۰-۰۲۱

Email: arjmand1@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۳

عنوان چهارمین عامل مرگ و میر در میان زنان مطرح می‌باشد [۱]. در ایران نیز طبق آمار سال ۲۰۱۲میلادی، این بیماری به عنوان هشتمین عامل مرگ معرفی شده است [۲]. اکثر تومورهای بدخیم تخمدانی (کارسینوما)، در گروه سلول‌های اپیتلیالی قرار می‌گیرند و حاصل بسیاری از ناپایداری‌های ژنتیکی هستند. این تومورها به طور معمول، رشد خیلی سریع و به شدت پیش‌رونده‌ای دارند و به دلیل این‌که به سرعت به بیرون تخمدان خصوصاً پریتونئوم و لوله‌های فالوپ پیش می‌روند، معمولاً تشخیص آن‌ها زمانی صورت می‌گیرد که علاوه بر تخمدان سایر قسمت‌ها را نیز درگیر کرده باشد [۳]. برداشت توده سرطانی و پروسه شیمی‌درمانی مهم‌ترین روش درمانی انواع سرطان‌ها، از جمله سرطان تخمدان می‌باشد. سیس‌پلاتین یکی از متداول‌ترین داروهای ضد سرطان می‌باشد که می‌تواند به تنهایی و یا در ترکیب با دیگر داروهای شیمی‌درمانی جهت درمان سرطان‌های سر و گردن، تخمدان و ریه مورد استفاده قرار گیرد. این دارو با اتم‌های نیتروژن آدنین و گوانین مولکول DNA واکنش داده و سبب آسیب DNA سلول‌های سرطانی و مسدود نمودن تقسیم سلولی و در نتیجه مرگ سلولی می‌گردد. با این حال علی‌رغم کارایی اولیه این دارو، استفاده طولانی‌مدت آن سبب بروز مقاومت دارویی می‌شود تا جایی که، به‌وجود آمدن مقاومت دارویی بر علیه سیس‌پلاتین در سرطان تخمدان هم‌چنان به عنوان یک سد اصلی در برابر شیمی‌درمانی بیماران مبتلا محسوب می‌شود [۵،۴].

علم متابولومیکس علم پیشرو و قدرتمندی است که قادر به بررسی هزاران متابولیت در بافت و مایعات بدن می‌باشد. این علم در ارتباط با تعیین و اندازه‌گیری‌های کمی و کیفی تمامی متابولیت‌ها و محصولات متابولیکی فعال در مسیرهای بیوشیمیایی سلول، بافت یا ارگان موجود زنده است. روش ^{1}H-NMR امروزه به طور وسیعی در علم متابولومیکس مورد استفاده قرار می‌گیرد در مطالعه سرطان، این روش بیش‌تر بر روی فیزیوپاتولوژی تومورها و نیز بررسی سمیت داروها و مقاومت دارویی حاصله تمرکز می‌کند و در این زمینه، اغلب به دنبال بررسی پروفایل متابولیکی و شناسایی متابولیت‌های خاص و بیومارکرهای تشخیصی سرطان‌ها می‌باشد [۶].

علی‌رغم تلاش‌های صورت گرفته در زمینه کشف مسیرهای متابولیسمی انواع تومورها، مطالعات کم‌تری در زمینه شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی دخیل در مقاومت دارویی سیس‌پلاتین در افراد مبتلا به سرطان تخمدان صورت گرفته است لذا با توجه به میزان شیوع بالای سرطان سلول‌های بافت اپی‌تلیال تخمدان و روند شیمی‌درمانی و مشکلات حل نشده مقاومت دارویی با سیس‌پلاتین تاکنون، این مطالعه بر آن است تا به کمک روش ^{1}H-NMR و نیز بهره‌گیری از علم کمومتریکس، دو رده سلول سرطانی حساس و مقاوم به داروی سیس‌پلاتین تخمدان را با یک‌دیگر مقایسه، و مهم‌ترین مسیرهای بیوشیمیایی و متابولیت‌های تغییریافته شناسایی را نماید.

مواد و روش‌ها

مواد: محیط کشت، سرم جنین گوساله وآنتی‌بیوتیک‌ها از شرکت گیبکو (Gibco) خریداری شدند. پودر تترامتیل سیلان (TSP از شرکت سیگما Sigma) و آب دوتره از شرکت مصباح سازمان انرژی اتمی اراک تهیه شده است.

کشت سلول: دو رده سرطانی بافت اپیتلیال تخمدان حساس و مقاوم به داروی سیس‌پلاتین (A2780 و A2780 CP) از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران تهیه شد. هر یک از دو رده به طور جداگانه به صورت تک لایه در فلاسک کشت، همراه با محیط DMEM حاوی سرم جنین گوساله ۵٪ و پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شد و فلاسک‌های کشت سلول، تا زمان حصول تراکم سلولی ۸۵ تا ۹۰٪، در دمای ۳۷ °C و رطوبت ۹۵٪ و ۵٪ CO2 انکوبه شدند و سپس سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند به نحوی که در هر رده، ۵ نمونه با تعداد ۴×۱۰^{۷} سلول قرار گرفت.

استخراج متابولیت‌ها: به منظور جداسازی متابولیت‌های هیدروفیل و لیپوفیل سلول، استخراج متابولیت‌های سلولی با افزودن نسبت ۲ به ۱ متانول و کلروفرم سرد در دمای ۴ درجه

سانتی‌گراد صورت گرفت و سپس نسبت ۱ به ۱، کلروفرم و آب دوبار تقطیر به نمونه اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سونیکیت شد. پس از سانتریفیوژ، لایه متابولیت‌های هیدروفیل تشکیل شده جمع‌آوری و لیوفیلیزه شد [۸،۷].

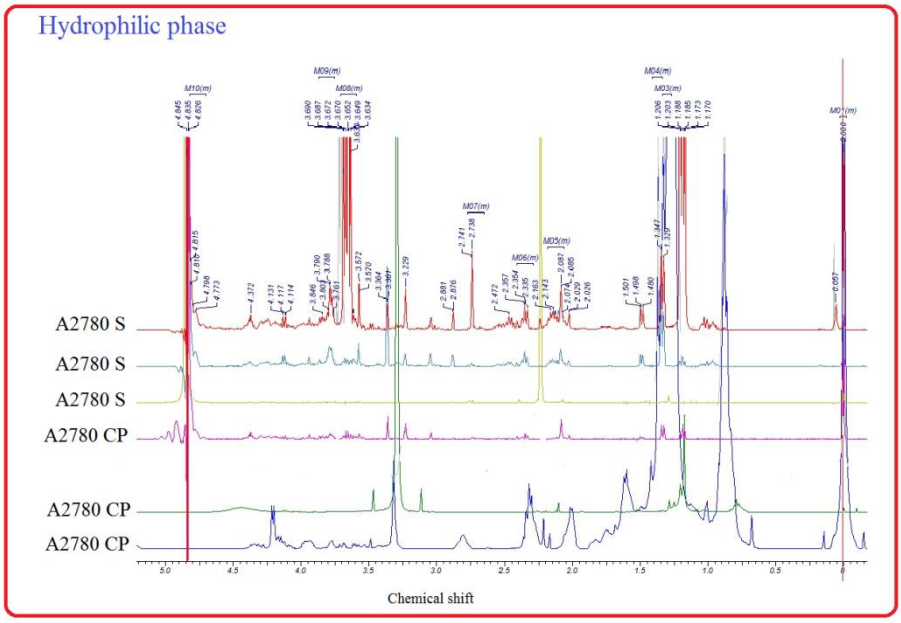
آماده‌سازی و طیف سنجی NMR: به هر یک از نمونه‌های لیوفیلیزه شده، ۵۰۰ میکرولیتر فسفات بافر۱۰۰ میلی‌مولار تهیه شده با آب دوتره و TSP ۱ میلی‌مولار اضافه شد و سپس به مدت ۱۵دقیقه با پروتکل NOESY در دستگاه NMR بروکر ۴۰۰ مگاهرتز دانشکده شیمی دانشگاه زنجان، طیف سنجی صورت گرفت [۸،۷].

مراحل آنالیز آماری داده‌های حاصل از NMR: پردازش اولیه فایل داده‌های خام دو گروه سلولی حساس و مقاوم به دارو، به کمک کد محاسباتی پرومتب در محیط نرم‌افزاری MATLAB صورت گرفت. به کمک این کد محاسباتی، طیف‌های هر نمونه در محدوده صفر تا ppm ۱۰، به قطعاتی با فواصل ۰/۰۰۵ تقسیم شد. همچنین پیک آب در محدوده ۷/۴ppm نیز حذف گردید. به منظور خوشه‌بندی داده‌های حاصله با روش آنالیز اجزای اصلی (PCA)، به پایگاه متابوآنالیست به آدرس www.MetaboAnalyst.ca مراجعه شد. داده‌های حاصل از آنالیز PCA به صورت Score Plot و Loading Plot در شکل‌های شماره ۲ و ۳ نمایش داده شده‌اند. Score Plot نشان‌دهنده ارتباط میان گروه‌های مورد آنالیز می‌باشد و Loading Plot نیز بیانگر ارتباط میان متابولیت‌ها است. در مرحله بعد، با مراجعه به پایگاه داده متابولوم انسانی و معرفی جابه‌جایی‌های شیمیایی حاصل از Loading Plot، نام متابولیت‌ها مشخص شد و با معرفی این متابولیت‌ها به پایگاه متابوآنالیست، مهم‌ترین تغییرات مسیرهای بیوشیمیایی دخیل در مقاومت دارویی سیس‌پلاتین شناسایی شدند.

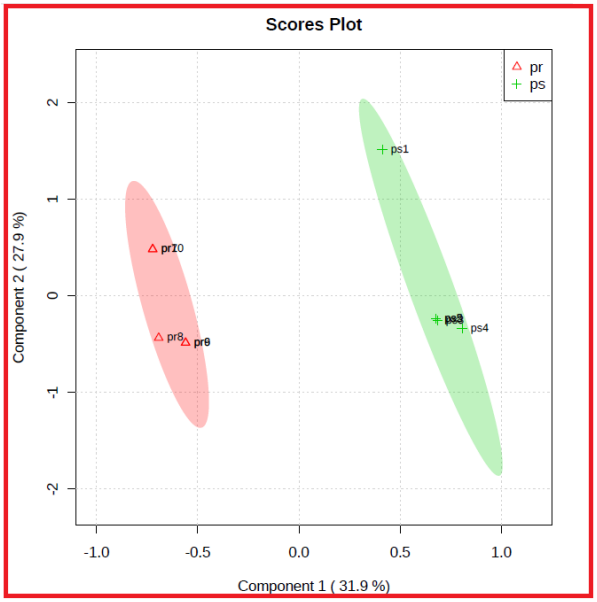
نتایج

نتایج به‌دست آمده از طیف سنجی NMR دو رده حساس و مقاوم به دارو در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج Score Plot حاصل از این بررسی نیز که در شکل ۲ نمایش داده شده است، بیانگر آن است که آنالیز PCA توانسته به‌راحتی، داده‌های حاصل از دو گروه حساس و مقاوم به دارو را از یک‌دیگر جدا نماید. هم‌چنین نتایج حاصل از Loading Plot که در شکل ۳ نشان داده شده است نیز ثابت می‌کند که آنالیز PCA در بررسی ما قادر بوده که متابولیت‌های متمایز دو گروه حساس و مقاوم به دارو را به خوبی نشان دهد.

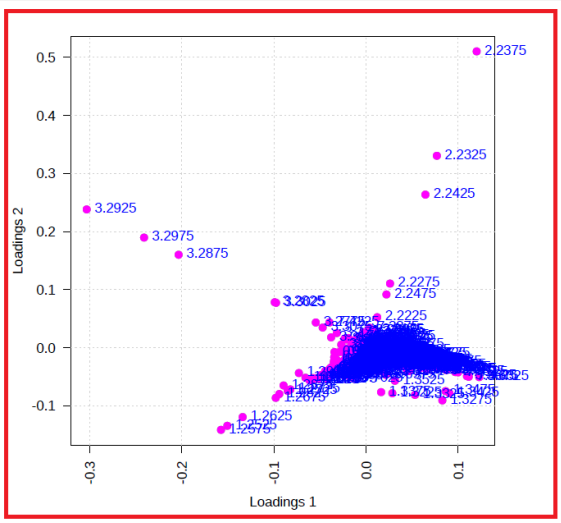


شکل ۱. طیف های حاصل از مقایسه سلول های حساس و مقاوم به دارو .



شکل ۲. Score Plot حاصل از آنالیز PCA: حروف P (Polar) و s (Sensitive) و r(Resistant) به ترتیب بیانگر قطبیت نمونه های گروه و مقاوم و حساس بودن به داروی سیس پلاتین می باشد و نقطه های یک رنگ، نشان دهندهٔ نمونه های موجود دریک گروه می‌باشد.

پس از معرفی مهم‌ترین جابه‌جایی‌های شیمیایی حاصل از Loading Plot به پایگاه متابولوم انسانی، متابولیت‌های متفاوت در دو گروه مشخص شدند که در جدول ۱ نشان داده شده. طبق این جدول، با توجه به مقدار خطای مثبت کاذب (FDR) و p value (سطح معنی‌دار آماری) کم‌تر از ۰/۰۵، عمده تغییرات متابولیتی صورت گرفته در روند مقاومت دارویی سیس‌پلاتین، مربوط به مسیرهای متابولیسمی گالاکتوز و نیز مسیر متابولیسمی فروکتوز و مانوز می‌باشد.



شکل ۳. گراف جداسازی متابولیت های دو گروه حساس و مقاوم به دارو بر اساس آنالیز اجزای اصلی.محور Y لودینگ ۱و محور Y لودینگ ۲ می باشد. اعداد داخل گراف نمایانگر جابجایی شیمیایی متابولیت ها می باشند.

بنابراین با توجه به اهمیت دو مسیر متابولیسمی گـالاکتوز و مسیر فروکتوز و مانوز در جدول ۲ متابولیت‌های تغییر یافته این دو مسیر به طور جداگانه نشان داده شده است.

جدول ۱. مهمترین مسیر های بیوشیمی موثردرمقاومت دارویی سیس پلاتین

خطای مثبت کاذب	سطح معنی دار آماری	متابولیت های تغییر کرده	کل متابولیت های مسیر	مسیر های بیوشیمیایی تغییر یافته
۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۰۳	۷	۴۱	متابولیسم گالاکتوز
۰/۰۴۴۶	۰/۰۰۱۱	۵	۴۸	متابولیسم فروکتوز و مانوز
۰/۰۸۵۰	۰/۰۰۳۲	۶	۸۸	متابولیسم قند ها و نوکلئوتیدهای آمینی
۰/۰۸۵۰	۰/۰۰۴۲	۴	۴۰	مسیر تجزیه والین، لوسین و ایزولوسین
۰/۰۱۵۱۶	۰/۰۰۹۴	۴	۵۰	مسیر متابولیسم نشاسته و سوکروز
۰/۵۲۹۳	۰/۰۳۹۶	۳	۴۵	مسیر متابولیسمی آسکوربات و آلدارات
۰/۶۷۵۷	۰/۰۷۶۰	۲	۲۷	مسیر بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین

جدول ۲. مهمترین تغییرات مسیرهای بیوشیمیایی و متابولیت های متفاوت در دو گروه سلول های حساس و مقاوم به سیس پلاتین تخمدانی

مسیربیوشیمی	متابولیت ها
مسیرمتابولیسمی گالاکتوز	گلیسرول – مانوز– سوربیتول – گالاکتونیت– آلفا لاکتوز – میواینوزیتول– ملیبیوز
مسیرمتابولیسم فروکتوز و مانوز	فوکوز – سوربیتول – مانیتول – مانوز – رامنوز

بحث و نتیجه‌گیری

تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی و نیاز بالای آن‌ها به انرژی و ترکیبات مورد نیاز، سبب تفاوت قابل توجه ویژگی‌های متابولیسمی این سلول‌ها نسبت به سلول‌های غیر سرطانی شده است. امروزه بسیاری از تغییرات متابولیسمی، آنزیمی و ترانسپورترهای دخیل در سرطان و مقاومت دارویی، هدف اصلی مطالعات متابولومیکس قرارگرفته‌اند. نتایج مطالعه ما نشان داد که مهم‌ترین تغییرات مسیرهای بیوشیمیایی صورت گرفته در روند مقاومت به داروی سیس‌پلاتین در بیماران مبتلا به سرطان بافت اپیتلیال تخمدان با تغییرات متابولیتی مسیرهای متابولیسم گالاکتوز و فروکتوز همراه بوده است.

مطالعات اخیر دانشمندان ثابت نموده که تخمدان یکی از مهم‌ترین اندام‌هایی است که نسبت به تجمع گالاکتوز و متابولیت‌های آن بسیار حساس می‌باشد. گرچه هنوز مکانیسم قطعی و مشخصی در ارتباط با مسیر متابولیسمی گالاکتوز و متابولیت‌هایش و نیز سمیت گالاکتوز در بروز سرطان تخمدان و مقاومت دارویی آن شناخته نشده است با این حال بر اساس مطالعات صورت گرفته قبلی، به نظر می‌رسد که سمیت ناشی از گالاکتوز و متابولیت‌هایش، بیش‌تر می‌تواند از طریق اختلال در روند آپوپتوز سلول‌های تخمدانی و نیز مسیرهای سیگنالینگ گنادوتروپین‌ها، سبب ایجاد سرطان تخمدان گردد [۹]. در مطالعه ما، گالاکتونیت یکی از متابولیت‌هایی است که غلظت آن در سلول‌های حساس و مقاوم به داروی سیس‌پلاتین با یک‌دیگر متفاوت بوده است. بر اساس شواهد موجود، در تخمدان غلظت موضعی آنزیم گالاکتوز ۱ فسفات یوریدیل ترانسفراز در مسیر گالاکتوز بسیار بالا می‌باشد [۱۰] و نقص در این آنزیم سبب تجمع متابولیت‌های گالاکتوز، گالاکتوز ۱ فسفات و گالاکتیتول می‌شود [۹] و گالاکتوز تجمع یافته در سلول از طریق آنزیم گالاکتوز دهیدروژناز به گالاکتونیت تبدیل می‌گردد. بر اساس نتایج فورگس (۲۰۰۶) و نیز نتایج لیو (۲۰۰۰)، به نظر می‌رسد که تجمع متابولیت‌هایی نظیر گالاکتونیت، گالاکتیتول و UDP گالاکتوز و گالاکتوز ۱ فسفات در تخمدان، از عوامل اصلی پاتوژنز تخمدانی در مسیر گالاکتوز می‌باشند [۹،۱۱]. لذا بر اساس نتایج مطالعات این محققین، از جمله مکانیسم‌هایی که در ایجاد سمیت و پاتوژنز تخمدانی توسط متابولیسم گالاکتوز مطرح است می‌توان به نقش این متابولیت‌ها در ایجاد استرس اکسیداتیو، نقص در مسیر آپوپتوز و نیز اختلال در گالاکتوزیلاسیون گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای غشایی این سلول‌ها اشاره نمود [۱۱]. نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که متابولیت‌های گالاکتونیت و لاکتوز و نیز گلیسرول و ملیبیوز و مانوز در مسیر متابولیسمی گالاکتوز سلول‌های تخمدان حساس و مقاوم به داروی سیس‌پلاتین با یک‌دیگر متفاوت می‌باشند. گر چه تاکنون مطالعه خاصی در ارتباط با نقش و مکانیسم اثر این متابولیت‌ها در ایجاد مقاومت دارویی صورت نگرفته است اما با توجه به مطالعات قبلی به نظر می‌رسد که شاید نقص در آنزیم گالاکتوز ۱ فسفات یوریدیل ترانسفراز و تجمع این متابولیت‌ها در سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو، سبب اختلال در گالاکتوزیلاسیون گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها و ترانسپورترهای فعال غشایی‌های شده و در نتیجه مانع از ورود داروی سیس‌پلاتین به سلول‌ها و ایجاد اثر در سلول‌های آدنوکارسینومای تخمدانی و یا خروج مقدار زیادی از دارو سیس‌پلاتین از طریق پمپ‌های غشایی به بیرون سلول و ایجاد مقاومت دارویی گردیده است.

مطالعه صورت گرفته بر روی سلول‌های سرطانی تخمدان ثابت نموده که متابولیت‌های میواینوزیتول و سوربیتول و گلوتاتیون احیا شده که در شروع روند سمزدایی سلولی و نیز ایجاد اسمولاریتی در سلول‌های سرطانی تخمدان اهمیت دارند، دست‌خوش تغییر شده‌اند [۱۲]. در مطالعات گروه باندو و همکارانش (۱۹۹۶) نیز افزایش غلظت سوربیتول در سلول‌های سرطانی ریه مقاوم به داروی سیس‌پلاتین به اثبات رسیده است [۱۳]. در مطالعه ما نیز متابولیت سوربیتول در مسیر متابولیسمی گالاکتوز و مسیر متابولیسمی فروکتوز و مانوز و نیز متابولیت میواینوزیتول در مسیر گالاکتوز، دست‌خوش تغییر شده‌اند که با توجه به نتایج مطالعات قبلی،

این طور به نظر می‌رسد که شاید در سلول‌های مقاوم به داروی سیس‌پلاتین نیز، تجمع گالاکتوز و در نتیجه افزایش غلظت این دو متابولیت، سبب بروز اختلال در روند فعالیت ATPase Na^+/K^+ و یا اختلال در روند آپوپتوز سلولی و مقاومت دارویی شده است.

به طور کلی، کربوهیدرات‌ها و خصوصاً منوساکاریدهایی مانند گلوکز و فروکتوز، که دارای قابلیت تبدیل به یک‌دیگر می‌باشند، از طریق مسیر گلیکولیزوسیکل کربس نقش مهمی را در متابولیسم سلول‌های سالم و سرطانی ایفا می‌نمایند [۱۴]. نتایج ما نیز نشان داد که مسیر متابولیسمی فروکتوز از طریق تغییر در متابولیت‌های فوکوز، سوربیتول، مانیتول، مانوز و رامنوز، در روند مقاومت به داروی سیس‌پلاتین دخالت دارد. به طور کلی این مسیر همراه با مسیر گلیکولیز، در تولید انرژی و نیز در سنتز ترکیباتی همچون اسیدهای چرب و اسیدهای نوکلئیک نقش مهمی را ایفا می‌نمایند [۱۵]. با این حال لیو و همکارانش اعلام نمودند که مسیر فروکتوز برای سنتز اسیدهای نوکلئیک بسیار فعال‌تر از مسیر گلوکز در سلول‌های سرطانی می‌باشد اسیدهای نوکلئیک و نوکلئوتیدها برای تکثیر بافت‌ها و خصوصاً سلول‌های سرطانی بسیار ضروری می‌باشند و این گروه اعلام نمودند که سلول‌های سرطانی با مصرف فروکتوز، قادرند که نوکلئیک اسیدهای اضافی را سنتز و سبب افزایش تکثیر سلول‌ها شوند [۱۴].

مسیر متابولیسمی فروکتوز، می‌تواند از طریق واسطه‌های متابولیتی خود، هم‌چون فروکتوز، مانوز، رامنوز، فوکوز و حتی سوربیتول، ارتباط بسیار نزدیکی با مسیر گلیکولیز داشته باشد. در سلول‌های سرطانی بر خلاف سلول‌های سالم، به دلیل اثر ثابت شده‌وار برگ، حجم عمده‌ای از انرژی مورد نیاز سلول‌ها از مسیر گلیکولیز تأمین می‌گردد و لذا مسیر فسفریلاسیون میتوکندریایی اکسیداتیو از اهمیت کم‌تری برخوردار می‌باشد. بنابراین با توجه به ارتباط بسیار نزدیکی که این دو مسیر با یک‌دیگر دارند، این‌طور به نظر می‌رسد که تغییرات متابولیتی مسیر فروکتوز، علاوه بر تأثیر در روند فعالیت‌هایی که بر عهده این مسیر می‌باشد، سبب تغییر در مسیر گلیکولیز نیز می‌گردد و لذا با توجه به نقش ثابت‌شده گلیکولیز در سلول‌های سرطانی، مسیر گلیکولیز و فروکتوز و اختلالات آن‌ها، در بهبود بیماری یا برعکس در متاستاز و مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی نقش مهمی را ایفا نمایند. افزایش گلیکولیز سلول‌های سرطانی سبب افزایش بیش‌تر ATP و NADPH می‌گردد و بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی، فعالیت ضد توموری خودشان را از طریق القای آسیب اکسیداتیو ناشی از افزایش NADPH انجام می‌دهند. میزان ATP افزایش یافته نیز می‌تواند سبب افزایش ترانسپورترهای ABC و در نتیجه، افزایش خروج دارو از سلول‌ها و ایجاد روند مقاومت دارویی گردد [۱۶،۱۵]. در مطالعه ما متابولیت‌های مانوز و سوربیتول علاوه بر مسیر گالاکتوز، در مسیر فروکتوز نیز دست‌خوش تغییر شده‌اند که با توجه به دلایل ذکر شده قبلی در ارتباط با مانوز و نقش آن در مسیر گالاکتوز، و نیز با توجه به وارد شدن این متابولیت از مسیر فروکتوز به مسیر گلیکولیز و نقش دو مسیر گلیکولیز و فروکتوز و متابولیت‌هایشان در تولید اسیدهای نوکلئیک و نیز روند مقاومت دارویی به نظر می‌رسد که مانوز می‌تواند به عنوان یک هدف دارویی مؤثر بر علیه مقاومت دارویی سیس‌پلاتین در نظر گرفته شود.

مانیتول یک ماده دیورتیک در بدن می‌باشد که در تنظیم اسمولاریتی سلول‌ها نقش دارد. تزریق این ماده به بیماران مبتلا به نفروتوکسیسیتی ناشی از مصرف داروی سیس‌پلاتین، سبب کاهش سمیت کلیوی این دارو می‌شود [۱۷]. لذا با توجه به نقش دیورتیک مانیتول در بدن و نیز با توجه به این مطالعه به نظر می‌رسد که احتمالاً مقدار این متابولیت در افرادی که دچار توکسسیتی ناشی از مصرف داروی سیس‌پلاتین می‌باشند کاهش داشته باشد.

به طور کلی، مطالعات بسیاری ثابت نمودند مقدار برخی از گلیکوپروتئین‌ها در بدخیمی افزایش می‌یابد. قند فوکوز نیز از جمله مهم‌ترین قندهای شرکت‌کننده در روند گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها می‌باشد که در بسیاری از سرطان‌ها افزایش یافته است [۱۸]. تحقیقات نشان داده که غلظت هاپتوگلوبولین که یک گلیکوپروتئین فاز حاد می‌باشد در سرطان تخمدان و

پستان افزایش می‌یابد [۱۹]. هم‌چنین ثابت شده که فوکوزیلاسیون با روند مقاومت دارویی سلول‌های کبدی در ارتباط است [۲۰]. افزایش فوکوز در سلول‌های سرطانی تخمدان و سینه سبب افزایش آنتی‌ژن دی‌فوکوزیل لوئیس y می‌گردد. این آنتی‌ژن در ۶۰ تا ۹۰ درصد سرطان‌های اپیتلیال تخمدان و سینه افزایش داشته است. مطالعات نشان می‌دهند که افزایش این آنتی‌ژن با افزایش مقاومت به داروهای ۵ فلئورویوراسیل، کربوپلاتین و پاکلی‌تاکسیل نیز در ارتباط می‌باشد [۲۲،۲۱]. مطالعه ما نیز تغییر در مقدار فوکوز سلول‌های حساس و مقاوم به داروی سیس‌پلاتین را در مسیر فروکتوز و مانوز و نیز مسیر قندها و نوکلئوتیدهای آمینی را نشان می‌دهد که با مطالعات صورت گرفته در این زمینه همسو می‌باشد.

در مجموع می‌توان گفت در شرایطی که شناسایی کامل ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در روند مقاومت دارویی سیس‌پلاتین، متحمل وقت و هزینه زیادی می‌باشد، بررسی متابولومیکس پروفایل متابولوم سلول‌های مقاوم و حساس به داروی سیس‌پلاتین، می‌تواند در مدت زمان کوتاه‌تری بخشی از تغییرات متابولیتی حاصل از تغییر در بیان ژن‌ها، فعالیت آنزیم‌ها و سایر فاکتورها را به صورت یک‌جا شناسایی نماید. مطالعه کنونی در واقع نشان داد که عمده‌ترین تغییرات متابولیتی دخیل در مقاومت دارویی سیس‌پلاتین ناشی از تغییر در برخی از متابولیت‌های مسیر کربوهیدرات‌های گالاکتوز و فروکتوز و مانوز بوده است. با این حال، درک بهتر مکانیسم‌های پایه‌ای مقاومت‌های دارویی و شناسایی بیومارکرهای جدید در این زمینه، نیازمند تحقیقات وسیع‌تر در این حیطه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نتایج موجود در این مقاله حاصل بخشی از یک پایان‌نامه مصوب دانشجویی در مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک دانشگاه علوم پزشکی زنجان می‌باشد که با همکاری صمیمانه اساتید و پرسنل بخش بیوشیمی انستیتو پاستور تهران به ثمر رسیده است.

منابع

[1] Metzger-Filho O, Moulin C, D'Hondt V. First-line systemic treatment of ovarian cancer: a critical review of available evidence and expectations for future directions. Curr Opin Oncol 2010; 22: 513-520.

[2] Akbari ME KM. Incidence, mortality and burden of cancers in Iran. Cancer Res Shahid Beheshti Univ Med Sci 2008: 95-125. (Persian)

[3] Kurman RJ, Shih Ie M. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. Int J Gynecol Pathol 2008; 27: 151-160.

[4] Ronconi L, Giovagnini L, Marzano C, Bettìo F, Graziani R, Pilloni G, Fregona D. Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. Inorg Chem 2005; 44: 1867-1881.

[5] Lee RX, Li QQ, Reed E. Beta-elemene effectively suppresses the growth and survival of both platinum-sensitive and -resistant ovarian tumor cells. Anticancer Res 2012; 32: 3103-3113.

[6] Lehnhardt FG, Bock C, Röhn G, Ernestus RI, Hoehn M. Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a 1H NMR spectroscopic investigation. NMR Biomed 2005; 18: 371-382.

[7] Gottschalk M, Ivanova G, Collins DM, Eustace A, O'Connor R, Brougham DF. Metabolomic studies of human lung carcinoma cell lines using in vitro (1)H NMR of whole cells and cellular extracts. NMR Biomed 2008; 21: 809-819.

[8] Lodi A, Ronen SM. Magnetic resonance spectroscopy detectable metabolomic fingerprint of response to antineoplastic treatment. PLoS One 2011; 6: e26155.

[9] Liu G, Hale GE, Hughes CL. Galactose metabolism and ovarian toxicity. Reprod Toxicol 2000; 14: 377-384.

[10] Xu YK, Ng WG, Kaufman FR, Lobo RA, Donnell GN. Galactose metabolism in human ovarian tissue. Pediatr Res 1989; 25: 151-155.

[11] Forges T, Monnier-Barbarino P, Leheup B, Jouvet P. Pathophysiology of impaired ovarian function in galactosaemia. Hum Reprod Update 2006; 12: 573-584.

[12] Ferretti A, D'Ascenzo S, Knijn A, Iorio E, Dolo V, Pavan A, Podo F. Detection of polyol accumulation in a new ovarian carcinoma cell line, CABA I: a1H NMR study. Br J Cancer 2002; 86: 1180-1187.

[13] Bando T, Fujimura M, Kasahara K, Shibata K, Shirasaki H, Heki U, et al. Exposure to sorbitol induces resistance to cisplatin in human non-small-cell lung cancer cell lines. Anticancer Res 1996; 17: 3345-3348.

[14] Liu H, Huang D, McArthur DL, Boros LG, Nissen N, Heaney AP. Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth. Cancer Res 2010; 70: 6368-6376.

[15] Poliakov E, Managadze D, Rogozin IB. Generalized portrait of cancer metabolic pathways inferred from a list of genes overexpressed in cancer. Genet Res Int 2014; 2014: 646193.

[16] Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. Cell Death Dis 2013; 4: e532.

[17] Piccart M, Lamb H, Vermorken JB. Current and future potential roles of the platinum drugs in the treatment of ovarian cancer. Annal Oncol 2001; 12: 1195-1203.

[18] Tatsumura T, Sato H, Mori A, Komori Y, Yamamoto K, Fukatani G, Kuno S. Clinical significance of fucose level in glycoprotein fraction of serum in patients with malignant tumors. Cancer Res 1977; 37: 4101-4103.

[19] Thompson S, Dargan E, Turner GA. Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer. Cancer Lett 1992; 66: 43-48.

[20] Kudo T, Nakagawa H, Takahashi M, Hamaguchi J, Kamiyama N, Yokoo H, et al. N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. Mol Cancer 2007; 6: 32.

[21] Pochechueva T, Jacob F, Fedier A, Heinzelmann-Schwarz V. Tumor-associated glycans and their role in gynecological cancers: accelerating translational research by novel high-throughput approaches. Metabolites 2012; 2: 913-939.

[22] Hu Z, Gao J, Zhang D, Liu Q, Yan L, Gao L, et al. High expression of Lewis y antigen and CD44 is correlated with resistance to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. PloS One 2013; 8: e57250.

Metabolome profile comparison of cisplatin sensitive and resistant in ovarian epithelial cells by magnetic resonance spectroscopy spectroscopy

Ziba Akbari (M.Sc)[1,3], Ali Awsat Mellati (Ph.D)[1], Amir Amanzadeh (Ph.D)[2], Aboalfazl Nazarian (Ph.D)[1], Zahra Zamani (Ph.D)[3], Mohammad Arjmand (Ph.D) [*3]

1 - Zanjan Metabolic Disease Research Center and Biochemistry Dept., Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

2 - National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3 – Dept. of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received: 22 Jul 2015; Accepted: 30 Dec 2015)

Introduction*:* Epithelial ovarian carcinoma is considered to be the most lethal gynecological malignancy in women and accounts for more than 85% of ovarian carcinomas. The chemotherapeutical treatment of choice is cisplatin. However, long-term use of this drug mostly results in drug resistance phenomenon. Metabolomics, is a highly resourceful technique, which acts promising in monitoring of tumor growth. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (1H-NMR) is a non-invasive and high reproducible technique used in metabolomics. In the present investigation, we tried to find biochemical pathways and their metabolic alterations in epithelial cells of ovarian carcinoma and study the mechanism involved in cisplatin drug resistance.

Materials and Methods*:* The cell lines A2780 and A2780CP were prepared. Methanol-chloroform-water extraction was performed.The hydrophilic layer were collected separately and cell1H-NMR spectroscopy were applied on a Bruker spectrometer operating at 400 MHz. After processing the data, outlier metabolites were identified and their biochemical pathways were worked out by Metaboanalyst and Human Metabolome Database.

Results*:* In the present study, the main altered metabolites were; fucose, sorbitol, mannitol, mannose, rhamnose, glycerol, galactonite, alpha lactose, myo-inositol and melibiose. The biochemical pathway enrichment analysis showed that galactose, fructose and mannose metabolism was the most prominent altered pathways.

Conclusion*:* Our results disclose that cisplatin resistance results from alteration in carbohydrates metabolites and their pathways. However, further study is needed to confirm these findings.

Keywords*:* Ovarian Carcinoma, Metabolomics, Cisplatin, Drug Resistance,[1]H-NMR

* Corresponding author. Tel: +98 21 66402770

arjmand1@yahoo.com