

Synergistic Therapeutic Effects of Cimetidine/Famotidine in Combination with Doxorubicin on Cancer Cell Lines

Ali Mandegari^{1,2},
Azadeh Gholami-Javadie³,
Mandana Jafari¹,
Salehe Sabouri^{4,5}

¹ Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

² Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

³ Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

⁴ Herbal and Traditional Medicine Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received April 15, 2018 ; Accepted September 30, 2018)

Abstract

Background and purpose: Combination therapy in cancer is a promising approach to increase efficacy and tolerability and to decrease adverse effects and drug resistance. Recently, anti-cancer properties of H₂-receptor antagonists have been reported in several pre-clinical and clinical studies. The aim of this study was to examine the effect of cimetidine and famotidine H₂-blockers on cytotoxicity of doxorubicin (DOX) on A549, MCF-7, and HT-29 human cancer cell lines.

Materials and methods: The cytotoxicity of cimetidine and famotidine, alone and in combination with DOX, was determined using MTT assay after 24 h incubation.

Results: Co-administration of H₂-blockers with DOX led to an increase in cytotoxicity of the cell lines studied. While DOX at 1 μ M could not reduce the viability of the cultured cells below 50%, its use in combination with cimetidine or famotidine at 25 μ M reduced the percentage of viable cells below 50%.

Conclusion: Combination of cimetidine/famotidine with DOX could be a potential candidate for chemotherapy.

Keywords: combination therapy, H₂-blockers, doxorubicin, A549, MCF-7, HT-29

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (170): 180-185 (Persian).

* Corresponding Author: Salehe Sabouri - Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
(E-mail: ssabouri@kmu.ac.ir)

اثرات درمانی هم افزایی سایمتیدین / فاموتیدین در ترکیب با دوکسوروبیسین بر روی رده های سلولی سرطانی

علی ماندگاری^{۱،۲}
آزاده غلامی جوادیه^۳
ماندانا جعفری^۱
صالحه صبوری^{۵،۴}

چکیده

سابقه و هدف: درمان ترکیبی سرطان، روشی نوید بخش برای افزایش کارایی و تحمل پذیری و کاهش اثرات جانبی و مقاومت دارویی است. اخیراً، خواص ضد سرطانی آنتاگونیست های گیرنده H2 در چندین مطالعه پیش بالینی و بالینی گزارش شده است. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر H2-بلوکرهای سایمتیدین و فاموتیدین بر سمیت سلولی دوکسوروبیسین (DOX) بر رده های سلولی سرطانی انسانی A549، MCF-7 و HT-29 بود.

مواد و روش ها: سمیت سلولی سایمتیدین و فاموتیدین به تنهایی و در ترکیب با DOX با استفاده از آزمون MTT پس از آنکوباسیون ۲۴ ساعته تعیین شد.

یافته ها: استفاده همزمان از H2-بلوکرها با DOX منجر به افزایش سمیت در سلول های مورد مطالعه شد. در حالی که DOX در غلظت ۱ میکرومولار قادر به کاهش زنده مانی سلول های کشت شده به زیر ۵۰ درصد نبود، استفاده از آن در ترکیب با سایمتیدین یا فاموتیدین ۲۵ میکرومولار باعث کاهش درصد سلول های زنده به زیر ۵۰ درصد شد. **استنتاج:** تجویز همزمان سایمتیدین / فاموتیدین با DOX می تواند کاندیدی برای شیمی درمانی باشد.

واژه های کلیدی: درمان ترکیبی، H2-بلوکرها، دوکسوروبیسین، A549، MCF-7، HT-29

مقدمه

دوکسوروبیسین است که در تعدادی از بیماران، مقاومت به آن بروز می کند (۴). مشکل دیگر دوکسوروبیسین، آسیب به میوکارد وابسته به دوز بوده که ممکن است به نارسایی احتقانی قلب (CHF) منجر شود. به همین دلیل است که در برخی بیماران، حتی با وجود پاسخ مناسب به این دارو، امکان ادامه درمان با آن سلب می شود (۵).

امروزه درمان سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر، به یکی از چالش های سیستم پزشکی در جهان تبدیل شده است (۱). سرطان پستان، ریه و کولورکتال از شایع ترین سرطان ها هستند که آمار ابتلا به آن ها در ایران نیز رو به افزایش است (۲،۳). یکی از درمان های رایج انواع سرطان ها، شیمی درمانی با داروهای مانند

E-mail: ssabouri@kmu.ac.ir

مؤلف مسئول: صالحه صبوری - کرمان: بلوار هفت باغ علوی، پردیس دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی

۱. مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲. دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۴. مرکز تحقیقات داروهای گیاهی و سنتی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۵. استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۲/۱۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۷/۸

مواد و روش‌ها

برای این مطالعه، رده‌های سلولی A549، MCF-7 و HT-29 از بانک سلولی جهاد دانشگاهی تهیه شدند و در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی جنین (FBS)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر (U/mL) پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (μg/mL) استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد فشار CO₂ با رطوبت کافی کشت داده شدند. پس از اینکه سلول‌ها به میزان ۸۰ درصد فلاسک‌ها را پر کردند، از رده‌های سلولی A549 و MCF-7 تعداد ۱×۱۰^۴ و از رده سلولی HT-29 تعداد ۱/۳×۱۰^۴ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل، در پلیت‌های ۹۶ خانه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط مذکور، غلظت‌های مختلف فاموتیدین (India, Wuasavaa pharmaceutical) و سایمتیدین (China, Wuxi kaili pharmaceutical) حل شده در محیط کشت فاقد سرم به طور جداگانه (۱، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) به شش خانه از هر رده سلولی اضافه شد. از محیط کشت به عنوان کنترل منفی و از دو کسورویسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر معرف MTT (5 mg/mL) به خانه‌ها اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شدند و نهایتاً پس از خالی کردن چاهک‌ها و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان، جذب در ۵۷۰ نانومتر خوانده شده و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد (۱۲). لازم به ذکر است که هر آزمایش سه بار تکرار شد. پس از تعیین IC₅₀ داروها، دو غلظت کم‌تر از IC₅₀ فاموتیدین و سایمتیدین (۵ و ۲۵ میکرومولار) در ترکیب با دو غلظت کم‌تر از IC₅₀ دو کسورویسین (۰/۵ و ۱ میکرومولار) بر روی سه رده سلولی مورد بررسی قرار گرفت. تیمار با دو دارو به صورت همزمان انجام گرفت. نتایج با استفاده از آزمون آنالیز یک طرفه واریانس و انتخاب post hoc Tukey با سطح معنی‌داری p-value معادل ۰/۰۵ مورد ارزیابی

بنابراین، تاکنون مطالعاتی صورت گرفته که به نحوی بر این مسائل فائق آیند از جمله استفاده از RNA مداخله گر کوچک (siRNA) برای خاموش کردن ژن تولیدکننده پروتئین خارج‌کننده دوکسورویسین از سلول (۶)، استفاده از سیستم‌های دارورسانی جدید مانند نانوپارتیکل‌های هیبریدی پلیمر-لیپید (۷) و درمان ترکیبی با سایر داروها مثل پاکلیتاکسل که علی‌رغم اثربخشی بیش‌تر، مشکلات قلبی را کم نکرده است (۸). سایمتیدین در اواخر دهه ۱۹۷۰ برای درمان زخم‌های دستگاه گوارش فوقانی، معرفی شد. از آنجایی‌که مشخص شده بود خطر ابتلا به سرطان معده در افراد با ترشح کم اسید معده، بیش‌تر است، دانشمندان اندیشیدند که مهارکننده‌های گیرنده هیستامینی-۲ (H₂) با مهار ترشح اسید معده ممکن است باعث افزایش بروز تومورهای سیستم گوارش شوند و یکی از اولین داروهای این دسته به نام تیوتیدین به دلیل افزایش بروز تومورهای معده در رت، از مرحله آزمایشات پیش‌بالینی، فراتر نرفت. اما تاکنون نه تنها شاهدهی بر این اثر از سایمتیدین و سایر مهارکننده‌های گیرنده H₂ یافت نشده بلکه حتی عکس آن ثابت شده است (۹). اولین بار در سال ۱۹۸۸، Burtin و همکارانش بیماران مبتلا به سرطان‌های گوارشی که قادر به دریافت داروهای ضد سرطان رایج نبودند را تحت درمان با هیستامین و سایمتیدین یا رانیتیدین قرار دادند و مشخص شد که بقای بیماران با دریافت این داروها افزایش چشمگیری داشته است (۱۰). پس از آن، مطالعات دیگر نیز حاکی از اثرات مفید سایمتیدین در درمان سرطان معده، کولورکتال و تخمدان بودند. اگرچه در برخی مطالعات، نتایج ضد و نقیض بوده و اثربخشی قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد (۱۱، ۹). تاکنون تعداد معدودی بررسی بالینی در استفاده از سایمتیدین با سایر داروها برای بیماران مبتلا به سرطان صورت گرفته است، اما تعداد مطالعات برون تن کم‌تر است. بنابراین در مطالعه حاضر به بررسی اثر ترکیبی سایمتیدین یا فاموتیدین با دو کسورویسین بر روی رده‌های سلولی سرطانی پرداخته شده است.

قرار گرفت. میزان IC_{50} با تست probit نرم افزار SPSS ver 18 محاسبه شد.

یافته ها و بحث

سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت درمان با غلظت‌های مختلف سایمتیدین، فاموتیدین یا دوکسوروبیسین قرار گرفتند. پس از انجام محاسبات لازم، میزان IC_{50} هر یک از داروها بر روی رده‌های سلولی مذکور به دست آمد (جدول شماره ۱). طبق این نتایج، سایمتیدین و فاموتیدین در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار (وابسته به رده سلولی)، موجب مهار رشد نیمی از سلول‌ها شدند. لذا برای استفاده همزمان با دوکسوروبیسین، از غلظت‌های ۵ و ۲۵ میکرومولار که درصد زنده مانی سلول‌ها بین ۶۰ تا ۸۰ درصد بود استفاده شد.

جدول شماره ۱: مقادیر IC_{50} محاسبه شده سایمتیدین و فاموتیدین بر روی رده‌های سلولی A549، MCF7 و HT-29. مقادیر به صورت $mean \pm S.E.M$ گزارش شده است

نام دارو	مقدار IC_{50} محاسبه شده (μM)		
	HT-29	MCF7	A549
سایمتیدین	$2.07 \pm 1.27/82$	138.05 ± 17.36	157.71 ± 18.44
فاموتیدین	265.34 ± 34.92	165.79 ± 23.31	159.85 ± 28.03
دوکسوروبیسین	6.02 ± 0.18	4.97 ± 0.18	6.24 ± 0.38

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که استفاده ترکیبی از این دو دارو با دوکسوروبیسین می‌تواند اثر سمیت سلولی دوکسوروبیسین را بر روی هر سه رده سلولی، تقویت کند (فایل ضمیمه ۱). در حالی که غلظت ۱ میکرومولار دوکسوروبیسین قادر به کاهش درصد زنده مانی سلول‌ها به زیر ۵۰ نبود، استفاده از آن به همراه سایمتیدین یا فاموتیدین ۲۵ میکرومولار، درصد زنده مانی سلول‌ها را به زیر ۵۰ کاهش داد. اهمیت این مطالعه از دو جنبه قابل بررسی است. یکی غلبه بر مقاومت دارویی که طبق تحقیقات، درمان ترکیبی با داروهایی با مسیرهای اثربخشی متفاوت روشی نویدبخش برای حل این مشکل است و دیگری کاهش عوارض جانبی داروها با کاهش مقدار مورد نیاز آن‌ها (۱۳). یادآورد

می‌شود که از مشکلات مهم مربوط به دوکسوروبیسین، مقاومت دارویی و عارضه آسیب به میوکارد وابسته به دوز است. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سایمتیدین و فاموتیدین قادرند سمیت سلولی دوکسوروبیسین را افزایش دهند به طوری که در غلظت کم‌تر از IC_{50} ، موجب مرگ نیمی از جمعیت سلولی شدند. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد سایمتیدین و سایر مهارکننده‌های H_2 که سالهاست برای درمان اولسر پپتیک استفاده می‌شوند، اثرات ضد توموری دارند. این داروها احتمالاً با سه مکانیسم عمل می‌کنند: مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، تحریک لنفوسیت‌ها با مهار عملکرد سرکوبگر سلول‌های T و مهار فعالیت هیستامین به عنوان فاکتور رشد سلول‌های سرطانی (۹). ممکن است خاصیت آنتی اکسیدانی مهارکننده‌های H_2 نیز در بروز اثرات ضد توموری نقش داشته باشد (۱۴).

Jiang و همکارانش در تحقیق خود بیان کردند که سایمتیدین موجب القای آپوپتوز در سلول‌های کشت داده شده سرطان معده (SGC-7901 و MGC-803) و نه سلول‌های طبیعی معده (GES-1) می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که سایمتیدین موجب کاهش مقدار Bcl-2 (پروتئین ضد آپوپتوز) و افزایش Bax (پروتئین القاکننده آپوپتوز) و فعال شدن کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ شده است. درمان با سایمتیدین در موش‌های زنوگرافت شده با SGC-7901 نیز مؤثر بوده و از رشد تومور و مرگ موش‌ها جلوگیری کرد (۱۵).

مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده نیز نشان داده که سایمتیدین موجب القای آپوپتوز وابسته به کاسپاز از طریق مهار فسفریلاسیون Akt در سلول‌های کلانژیوکاریسینوما (سرطان مجرای صفراوی) می‌شود. این بررسی در موش نیز از رشد تومور جلوگیری کرده است (۱۶).

Matsumoto و همکارانش که نشان داده بودند سایمتیدین با ممانعت از بیان ای-سلکتین (E-selectin) از اتصال سلول‌های سرطانی به سلول‌های اندوتلیال و بروز متاستاز جلوگیری می‌کند، در یک بررسی بالینی،

و کندزارتان یا پرایندوپریل) در درمان کارسینومای متاستاتیک سلول‌های کلیوی، مثبت ارزیابی شد (۱۹). با توجه به مطالعات قبلی و نتایج حاصل از این مطالعه، پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیش‌تری روی مهارکننده‌های گیرنده H_2 انجام شود تا با توجه به ایمنی این داروها، در صورت مشاهده اثرات مناسب، استفاده از آن‌ها در درمان سرطان وارد پروتکل‌های درمانی شود.

سپاسگزاری

نتایج این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکترای داروسازی است. نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان برای تأمین هزینه‌ها و حمایت مالی (طرح شماره ۹۴۰۳۱۶) کمال تشکر را دارند. این طرح با کد اخلاق IR.KMU.REC.1394.259 در این دانشگاه علوم پزشکی کرمان پذیرفته شده است.

به تعدادی از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، علاوه بر ۵-فلورواوراسیل (5-Fu)، سایمتیدین نیز دادند. مشخص شد که شانس زنده ماندن این بیماران در مقابل گروه کنترل (5-Fu به تنهایی) بیش‌تر بود. مطالعه مشخص کرد سایمتیدین به ویژه برای بیمارانی که در سطح سلول‌های سرطانی آن‌ها لیگاند ای-سلکتین یعنی آنتی ژن‌های سیالین لوئیس (sialyl Lewis^x) بیش‌تری وجود داشت، مؤثرتر است (۱۷).

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام شد، از اثرات مفید درمان با رانیتیدین در مراحل اولیه سرطان پستان خبر می‌دهد (۱۸). درمان ترکیبی سرطان تخمدان با داروهای پلاتین دار و سایمتیدین هم که به صورت بالینی در ۲۸ بیمار انجام شده، موفقیت‌آمیز بوده است (۱۱). در مطالعه دیگری نیز اثر ترکیب چهار دسته داروی متفاوت (ایتترفرون آلفا، سایمتیدین، ملوکسیکام

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(1): 7-30.
2. Naghibi S, Shojaizadeh D, Montazeri A, Yazdani-Cherati J. Epidemiology of breast cancer in Mazandaran province, 2009-2010. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(102): 112-119 (Persian).
3. Almasi S, Salehiniya H. Trends in colorectal cancer incidence in Iran. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24(122): 389-394 (Persian).
4. Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol* 2010; 596: 47-76.
5. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 2003; 97(11): 2869-2879.
6. Navarro G, Sawant RR, Biswas S, Essex S, Tros de Ilarduya C, Torchilin VP. P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Nanomedicine (Lond)* 2012; 7(1): 65-78.
7. Wong HL, Rauth AM, Bendayan R, Manias JL, Ramaswamy M, Liu Z, et al. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm Res* 2006; 23(7): 1574-1585.
8. Mavroudis D, Kouroussis C, Kakolyris S, Agelaki S, Kalbakis K, Androulakis N, et al. Phase I study of paclitaxel (taxol) and pegylated liposomal doxorubicin (caelyx) administered every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Oncology* 2002; 62(3): 216-222.
9. Siegers CP, Andresen S, Keogh J. Does cimetidine improve prospects for cancer patients? A reappraisal of the evidence to date. *Digestion* 1999; 60(5): 415-421.

10. Burtin C, Noirot C, Scheinmann P, Galoppin L, Sabolovic D, Bernard P. Clinical improvement in advanced cancer disease after treatment combining histamine and H₂-antihistaminics (ranitidine or cimetidine). *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24(2): 161-167.
11. Niwa K, Onogi K, Wu Y, Mori H, Inoue Y, Tamaya T. Prognostic implications of cimetidine on advanced serous ovarian carcinoma related to cyclooxygenase-2 expression. *Mol Med Rep* 2008; 1(1): 119-122.
12. Shokrzadeh M, Ebrahimnejad P, Omidi M, Shadboorestan A, Zaalzar Z. Cytotoxicity evaluation of docetaxel nanoparticles by culturing HepG2 carcinoma cell lines. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 22(90): 2-10 (Persian).
13. Mandegary A, Torshabi M, Seyedabadi M, Amirheidari B, Sharif E, Ghahremani MH. Indomethacin-enhanced anticancer effect of arsenic trioxide in A549 cell line: involvement of apoptosis and phospho-ERK and p38 MAPK pathways. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 237543.
14. Ahmadi A, Ebrahimzadeh M, Ahmad Ashrafi S, Karami M, Mahdavi M, Saravi S. Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H₂ receptor antagonists. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25(1): 72-79.
15. Jiang CG, Liu FR, Yu M, Li JB, Xu HM. Cimetidine induces apoptosis in gastric cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. *Oncol Rep* 2010; 23(3): 693-700.
16. Dana P, Vaeteewoottacham K, Kariya R, Matsuda K, Wongkham S, Okada S. Repurposing cimetidine for cholangiocarcinoma: Antitumor effects *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Lett* 2017; 13(3): 1432-1436.
17. Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K, Suzuki H, Okamoto T. Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumour cells. *Br J Cancer* 2002; 86(2): 161-167.
18. Vila-Leahey A, Oldford SA, Marignani PA, Wang J, Haidl ID, Marshall JS. Ranitidine modifies myeloid cell populations and inhibits breast tumor development and spread in mice. *Oncoimmunology* 2016; 5(7): e1151591.
19. Tatokoro M, Fujii Y, Kawakami S, Saito K, Koga F, Matsuoka Y, *et al.* Phase-II trial of combination treatment of interferon-alpha, cimetidine, cyclooxygenase-2 inhibitor and renin-angiotensin-system inhibitor (I-CCA therapy) for advanced renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2011; 102(1): 137-143.