ORIGINAL ARTICLE

Investigatig of the Effects of N-Acetylcysteine on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress in HeLa Cells

Mahboube Rahmati Kukandeh[1,2]
Roya Fakhteh[3]
Mohammad Shokrzadeh[4,5]

[1]PhD Candidate in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Pharmacy Student, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran
[4] Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Center for Pharmaceutical Sciences Research, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 17, 2025; Accepted August 29, 2026)

Abstract

Background and purpose: Cyclophosphamide (CP) is an alkylating agent widely used in the treatment of hematological malignancies, various epithelial tumors, and certain non-malignant diseases. N-Acetylcysteine (NAC) is an antioxidant with free radical scavenging activity that helps restore intracellular reduced glutathione (GSH) levels, which are often depleted under conditions of increased oxidative stress and inflammation. Therefore, this study was designed to investigate the protective effect of N-acetylcysteine against cyclophosphamide-induced oxidative stress in the HeLa cell line.

Materials and methods: In the first phase of this study, HeLa cells were treated with increasing concentrations of cyclophosphamide, which was used as a cytotoxic model agent, to determine the optimal toxic concentration corresponding to the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}). Subsequently, the effects of different concentrations of N-acetylcysteine (NAC), administered as a pretreatment before exposure to cyclophosphamide at its IC_{50} concentration, were evaluated. Cell viability and survival were assessed using the MTT assay, while oxidative stress was examined by measuring reactive oxygen species (ROS) levels and GSH content.

Results: Cyclophosphamide at a concentration of 4.56 µg/mL significantly reduced HeLa cell viability, increased ROS levels, and decreased GSH levels compared with the control group ($P < 0.001$). Pretreatment with NAC before cyclophosphamide exposure increased cell viability, reduced ROS production, and elevated GSH levels in a concentration-dependent manner. These changes were significant at NAC concentrations ranging from 31.25 to 250 µg/mL compared with cyclophosphamide treatment alone ($P < 0.001$).

Conclusion: The findings of this study suggest that N-acetylcysteine (NAC) may attenuate cyclophosphamide-induced cytotoxicity and oxidative stress in cervical cancer cells and may exert a protective effect.

Keywords: n-acetylcysteine, cyclophosphamide, reactive oxygen species, glutathione

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (260): 94-104 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Shokrzadeh - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: Mslamuki@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و ششم شماره ۲۶۰ شهریور سال ۱۴۰۵ (۱۰۴-۹۴)

بررسی اثر ان استیل سیستئین بر استرس اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید در رده سلولی Hela

محبوبه رحمتی کوکنده [۱،۲]
رویا فاخته [۳]
محمد شکرزاده [۴،۵]

چکیده

سابقه و هدف: سیکلوفسفامید (CP) یک عامل آلکیله کننده است که به طور گسترده برای درمان بدخیمی های خونی و انواع تومورهای اپیتلیال و همچنین برای درمان برخی از بیماری‌های غیر سرطانی استفاده می‌شود. N–استیل سیستئین (NAC) یک آنتی اکسیدان با فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد است که مجموعه‌ای از گلوتاتیون احیاء شده درون سلولی (GSH) را بازیابی می کند، که اغلب در نتیجه افزایش وضعیت استرس اکسیداتیو و التهاب تخلیه می‌شود. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ان استیل سیستئین در استرس اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید در رده سلولی Hela، طراحی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، در گام نخست داروی سیکلوفسفامید به عنوان مدل سایتوتوکسیک با دامنه غلظتی کم به زیاد در سلول‌های Hela تیمار شد تا میزان غلظت اپتیمم سمی (IC_{50}) به‌دست آمد. در ادامه اثرات N–استیل سیستئین در غلظت‌های متفاوت به همراه سیکلوفسفامید در غلظت IC50 به صورت پیش تیمار برای سنجش بقا و زنده مانی سلول به روش MTT و هم چنین ارزیابی تست های استرس اکسیداتیو (ROS و گلوتاتیون) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: سیکلوفسفامید با غلظت ۴/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر، موجب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های HeLa و افزایش سطح ROS و کاهش سطح GSH نسبت به گروه کنترل شد (P <۰/۰۰۱). پیش تیمار با NAC در ترکیب با سیکلوفسفامید، زنده‌مانی سلولی را افزایش، تولید ROS را کاهش و سطح GSH را به‌طور وابسته به غلظت افزایش داد؛ این تغییرات در غلظت‌های ۳۱/۲۵ تا ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نسبت به سیکلوفسفامید معنی‌دار بود (P <۰/۰۰۱).

استنتاج: N–استیل سیستئین به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان، سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید را در سلول های سرطانی دهانه رحم تعدیل کرده و اثرات محافظتی قابل توجهی از خود نشان می دهد.

واژه های کلیدی: ان استیل سیستئین، سیکلوفسفامید، ROS، گلوتاتیون

مولف مسئول: ،محمد شکرزاده– ساری: موسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران **E-mail:** Mslamuki@gmail.com

۱. دانشجوی دکترای تخصصی سم شناسی، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی داروسازی، پردیس رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران
۴. استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. مرکز تحقیقات علوم دارویی، موسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۴۰۳/۱۱/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۳/۱۲/۱ تاریخ تصویب : ۱۴۰۵/۶/۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

مقدمه

سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع زنان در سراسر جهان و یکی از سه سرطانی است که زنان کم‌تر از ۴۵ سال را تحت تاثیر قرار می‌دهد و یک چالش عمده جهانی در حوزه سلامت محسوب می‌شود(۱، ۲). سالانه در سراسر جهان بیش از ۵۷۰۰۰۰ زن مبتلا به سرطان دهانه رحم تشخیص داده می شود که از این تعداد ۳۱۱۰۰۰ نفر جان خود را از دست می دهند و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰، بروز جهانی سرطان دهانه رحم تقریباً ۵۰ درصد افزایش یابد(۵ - ۳). کارسینوژنز سرطان دهانه رحم چند عاملی در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر عوامل خطر شایع سرطان مانند مصرف دخانیات، رفتارهای جنسی پرخطر، استفاده طولانی مدت از قرص‌های ضدبارداری خوراکی، وضعیت اقتصادی پایین و سرکوب سیستم ایمنی ناشی از عفونت‌هایی مانند ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) یا داروهای سرکوب کننده ایمنی پس از پیوند عضو، مرتبط‌ترین عامل در بروز سرطان دهانه رحم، HPV است(۶). HPV پرخطر به ویژه نوع HPV16 و HPV18 عامل اصلی سرطان زایی دهانه رحم است که سبب ۷۰ تا ۷۲ درصد سرطان های مهاجم دهانه رحم می شود. HPV حاوی دو انکوپروتئین (E6 و E7) است که نقش اساسی در توسعه و پیشرفت سرطان دهانه رحم دارند. عفونت مداوم با انواع پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی با پاسخ های التهابی و تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) همراه است. در این زمینه، استرس اکسیداتیو، التهاب مزمن و ویروس پاپیلومای انسانی پرخطر می توانند به صورت هم افزایی عمل کنند(۷، ۸). در حال حاضر، درمان های اصلی سرطان دهانه رحم شامل جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی است که می‌توانند به تنهایی یا ترکیبی مورد استفاده قرار گیرند، البته این درمان ها بافت‌های بیمار و سالم را به طور یکسان تحت تأثیر قرار می‌دهند و عوارض جانبی متعددی ایجاد می‌کنند و همچنین هزینه بالایی به همراه دارند(۳، ۹).

سیکلوفسفامید یکی از قدیمی‌ترین داروهای ضد سرطان و شیمی درمانی و به عنوان یک عامل آلکیله کننده DNA رایج است که در سال ۱۹۵۸ کشف و در سال ۱۹۵۹ به درمان سرطان معرفی شد. این دارو همچنان پایه اصلی درمان بدخیمی‌های خونی از جمله لنفوم و لوسمی و همچنین انواع تومورهای اپیتلیال از جمله کارسینومای پستان، تخمدان و ریه با سلول‌های کوچک محسوب می‌شود(۱۰). بخش عمده‌ای از اثرات ضد نئوپلاستیک سیکلوفسفامید ناشی از فسفورامید موستارد است که از متابولیسم دارو توسط آنزیم‌های کبدی مانند سیتوکروم P-450 تشکیل می‌شود. آنزیم‌های کبدی ابتدا سیکلوفسفامید را به هیدروکسی سیکلوفسفامید تبدیل کرده و سپس به آلدوفسفامید متابولیزه می‌کنند. آلدوفسفامید به عامل آلکیله کننده فعال فسفورامید موستارد و آکرولئین شکسته می‌شود. متابولیت فعال فسفورامید، یک کاتیون حلقوی آزیریدینیوم بسیار واکنش‌پذیر تشکیل می‌دهد که می‌تواند با موقعیت N(7) گوانین و سیتیدین در DNA واکنش نشان دهد، می‌تواند سلول‌های سرطانی را از بین ببرد و همچنین می‌تواند اثر ایمنومدولاتوری داشته باشد. به دلیل وجود دو بخش واکنش‌پذیر در مولکول، می‌تواند پیوندهای متقاطع بین رشته‌ای و درون رشته‌ای DNA ایجاد کند. بنابراین اثرات سیکلوفسفامید وابسته به چرخه سلولی نیست. با این حال، همانند تمام عوامل آلکیله کننده، سلول‌های با تکثیر سریع بیش‌ترین حساسیت را به سیکلوفسفامید نشان می‌دهند(۱۴ - ۱۱). سکیلوفسفامید در دوزهای بالاتر می‌تواند منجر به لنفوپنی سلول T و سرکوب ایمنی، کم‌خونی، نوتروپنی، ترومبوسیتوپنی، ایجاد تومورهای ثانویه و ایجاد ناهنجاری‌هایی در دستگاه تناسلی، سمیت کلیوی، سمیت کبدی، سمیت قلبی شود. علاوه بر این، سبب تولید رادیکال‌های آزاد و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

استرس اکسیداتیو در بافت‌ها و سلول‌ها می‌شود. بنابراین، درمان‌های تکمیلی که بتوانند اثر ضد توموری سیکلوفسفامید را افزایش داده و عوارض جانبی آن را کاهش دهند، از اهمیت بسزایی برخوردار بوده و عوارض درمان با دوز بالای سیکلوفسفامید را کاهش خواهند داد(۱۷ - ۱۵). آکرولئین یک متابولیت سمی سیکلوفسفامید، مسئول تولید گونه‌های اکسیژن فعال بسیار واکنش‌پذیری (ROS) و افزایش لیپید پراکسیداسیون می‌باشد، با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت تداخل دارد و برای سلول‌های پستانداران موتاژن است(۱۸، ۱۹). آکرولئین به سرعت وارد سلول شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتریک اکسید داخل سلولی را تحریک می‌کند که منجر به تشکیل پرونوکسی‌نیتریت شده و نهایتاً به پیامد آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA داخل سلول می‌انجامد(۲۰).

ان-استیل‌سیستئین (NAC) دارویی است که توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) تأیید شد و همچنین توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO) به‌عنوان یک داروی ضروری شناخته می‌شود. این دارو به‌طور گسترده برای درمان مسمومیت با استامینوفن (پاراستامول) و اخیراً به‌عنوان یک عامل موکولیتیک در بیماری‌های تنفسی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲۱). در برخی کشورها، از جمله ایالات متحده، کانادا و استرالیا، NAC معمولاً به‌عنوان یک مکمل تغذیه‌ای بدون نسخه در دسترس است و به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی، جذابیت تجاری زیادی به‌عنوان یک نوتراسیوتیک دارد(۲۲). نقش اصلی NAC با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن مرتبط است که به حفظ تعادل ردوکس سلولی کمک می‌کند. به همین دلیل، پتانسیل درمانی آن به مجموعه‌ای از بیماری‌ها مربوط می‌شود که استرس اکسیداتیو در پاتوژنز و پیشرفت آن‌ها نقش دارد(۲۳، ۲۴). با این حال، مکانیسم‌هایی که NAC از طریق آن‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت سلولی خود را در شرایط فیزیولوژیک مختلف اعمال می‌کند، هنوز به‌طور کامل روشن نشده‌اند. علاقه روزافزون به بررسی اثرات مطلوب NAC نه تنها به عملکرد آن به‌عنوان یک محافظ قوی سلولی مربوط می‌شود، بلکه به ویژگی‌های فارماکوکینتیکی آن نیز ارتباط دارد؛ ویژگی‌هایی که شامل ایمنی، جذب و زیست دسترس پذیری بوده و با هزینه پایین آن همراه هستند(۲۵).از آنجایی که بر اثر مصرف داروهای شیمیایی از جمله سیکلوفسفامید، سطح سرمی برخی پارامترهای خونی مرتبط با اثرات تخریبی و یا التهابی آن در بافت‌های بدن تغییر می‌نمایند؛ بنابراین، استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند ان استیل سیستئین، می‌تواند در این راستا اثر بخش باشد. از این حیث، در این مطالعه به بررسی اثر ان استیل سیستئین در استرس اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید در رده سلولی Hela با روش ROS و گلوتاتیون پرداخته شد.

مواد و روش ها

کشت سلولی

در مطالعه تجربی حاضر با کد اخلاق IR.MAZUMS.RIB.REC.1403.056، رده سلولی Hela از بانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک خریداری و در محیط کشت DMEM-High Glucose حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین نگهداری شد. سلول‌ها در شرایط استاندارد انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2) رشد داده شدند و پس از رسیدن به تراکم ۸۰ – ۷۰ درصد با تریپسین - EDTA جداسازی و سانتریفیوژ گردیدند. زنده‌مانی سلول‌ها با آزمون تریپان بلو و هموسایتومتر بررسی شد و تنها سلول‌های با بیش از ۹۰ درصد بقا برای آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند(۲۶).

ارزیابی حیات سلول به روش MTT

روش MTT به‌منظور سنجش زنده‌مانی سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های کشت داده شده پس از تیمار با غلظت‌های مختلف NAC (۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدد با داروی سیکلوفسفامید در غلظت IC50 معادل ۴/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر مواجه شدند. سپس محلول MTTبا غلظت مناسب به هر چاهک افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۴ – ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط انکوباسیون استاندارد نگهداری شدند تا کریستال‌های فورمازان تشکیل گردد. پس از پایان انکوباسیون، محیط کشت خارج و کریستال‌ها با افزودن DMSO حل شدند. میزان جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA readerاندازه‌گیری شد. داده‌های به‌دست آمده برای محاسبه درصد زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل مورد تحلیل قرار گرفتند(۲۷).

اندازه‌گیری میزان ROS داخل سلولی

دی‌کلروفلوروسئین دی‌استات (DCFH-DA) به‌عنوان نشانگر برای تعیین سطح داخل‌سلولی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌های Hela مورد استفاده قرار گرفت. به‌طور خلاصه، سلول های Hela در پلیت ۹۶ خانه‌ای سیاه کشت داده شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رنگ DCFH-DA(۲۰ میکرومولار) انکوبه شدند. در ادامه، شدت فلورسانس با استفاده از دستگاه فلورسانس میکروپلیت‌خوان در طول موج تحریک ۴۸۰ نانومتر و طول موج نشر ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید(۲۸).

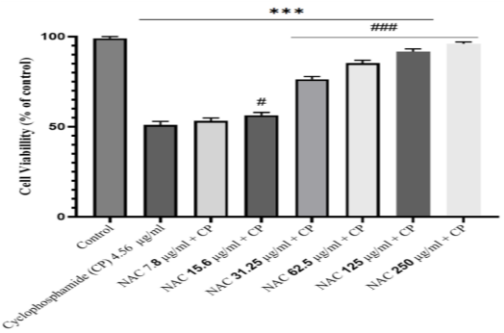
اندازه گیری سطح گلوتاتیون

ابتدا سلول‌های Hela با تراکم (۱×۱۰^{۷}) سلول در هر چاهک در پلیت شش‌خانه‌ای برای اندازه‌گیری سطح گلوتاتیون (GSH) بر اساس روش DNTB و طبق پروتکل کیت نوند سلامت کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵ درصد CO_2انکوبه گردیدند. پس از تیمار سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، سلول ها در ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب سلولی را با یک میلی‌لیتر Buffer Lysing هموژن شد و پس از سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی جدا گردید و به عنوان نمونه استفاده شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر رقت استاندارد و نمونه به چاهک ها اضافه شد. سپس مقدار مساوی از محلول DTNB آماده شد و آنزیم گلوتاتیون رودکتاز را مخلوط کرده و مقدار ۱۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل به چاهک ها اضافه گردید. در نهایت به مدت ۳۰ ثانیه پلیت انکوبه شد و سپس ۶۰ میکرولیتر محلول Cofactor به چاهک ها اضافه گردید و بلافاصله جذب نوری پلیت توسط دستگاه میکروپلیت ریدردر طول موج ۴۱۲ نانومتر قرائت شد. کلیه محاسبات آماری برای مقایسه IC_{50} ها با استفاده از نرم افزار آماری Prism Ver.8 و به روش مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Post test مربوطه (Tukey-Kramer multiple comprehension test) صورت گرفت و نمودارها توسط همین برنامه گرافیگی رسم شد.

یافته ها

بر اساس نتایج حاصل از تستMTT در نمودار شماره ۱، اثر غلظت‌های مختلف NAC بر زنده‌مانی سلول‌ها در حضور سیکلوفسفامید با غلظت ۴/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بررسی شده است. گروه کنترل دارای بالاترین میزان زنده‌مانی سلولی است (نزدیک به ۱۰۰ درصد)، در حالی‌که تیمار با سیکلوفسفامید به‌تنهایی منجر به کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها شده است ($P <$ ۰/۰۰۱). همچنین بین گروه NAC در دوزهای ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر به همراه سیکلوفسفامید، با گروه کنترل منفی اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ($P <$ ۰/۰۰۱). همچنین بین دوز ۳۱/۲۵ و دوزهای ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به همراه سیکلوفسفامید نسبت به گروه سیکلوفسفامید معنی‌دار می باشد (۰/۰۵> P)، ($P <$ ۰/۰۰۱).

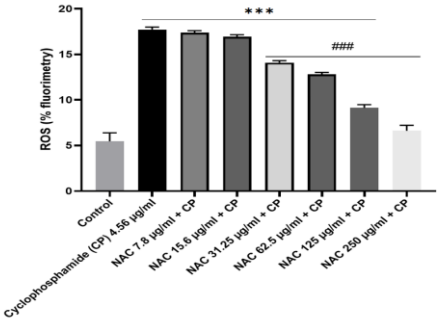
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]



نمودار شماره ۱: درصد بقای سلولی سلول های Hela در مواجهه با غلظت های مختلف NAC و غلظت ثابتی از داروی سیکلوفسفامید طی زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، ***: دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P<0.001)، ### دارای اختلاف معنی دار با گروه سیکلوفسفامید (P<0.001)، # دارای اختلاف معنی دار با گروه سیکلوفسفامید (P<0.05)

سنجش رادیکال های آزاد اکسیژن

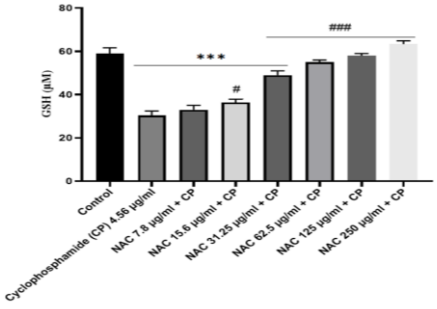
بر اساس نمودار شماره ۲، شدت تولید گونه های فعال اکسیژن در سلول های Hela در مواجهه سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش یافت (P <۰/۰۰۱). تیمار سلول ها با NAC در غلظت‌های مختلف از شدت تولید ROS کاست، به صورتی که در غلظت‌های ۷/۸ الی ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت (P <۰/۰۰۱). همچنین بین غلظت‌های ۳۱/۲۵ الی ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر NAC به همراه سیکلوفسفامید با گروه کنترل اختلاف به صورت معنی‌دار مشاهده شد (P <۰/۰۰۱).



نمودار شماره ۲: سنجش میزان تولید ROS در سلول های Hela در مواجهه با غلظت های مختلف NAC و غلظت ثابتی از داروی سیکلوفسفامید طی زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، ***: دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P<0.001)، ###: دارای اختلاف معنی دار با گروه سیکلوفسفامید (P<0.001)

سنجش گلوتاتیون

همان‌طور که در نمودار شماره ۳، نشان داده شده است، در گروه‌های تحت تیمار با NAC به همراه سیکلوفسفامید، با افزایش غلظت NAC، احیای گلوتاتیون مشاهده گردید. از لحاظ آماری، NAC در غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل است (P <۰/۰۰۱). نتایج نشان داد که در غلظت های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر NAC به همراه سیکلوفسفامید تفاوت معنی‌داری با گروه سیکلوفسفامید وجود دارد (P <۰/۰۵) (P <۰/۰۰۱). همچنین بین گروه کنترل و سیکلوفسفامید این معنی داری به صورت (P <۰/۰۰۱) مشاهده شد.



نمودار شماره ۳: سنجش میزان تولید گلوتاتیون در سلول های Hela در مواجهه با غلظت های مختلف NAC و غلظت ثابتی از داروی سیکلوفسفامید طی زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، ***: دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P<0.001)، ###: دارای اختلاف معنی دار با گروه سیکلوفسفامید (P<0.001)، #: دارای اختلاف معنی دار با گروه سیکلوفسفامید (P<0.05)

بحث

این مطالعه با هدف بررسی اثرات ان‌استیل سیستئین ر استرس اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید در رده سلولی Hela طراحی شد. نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌ها نشان دادند که سیکلوفسفامید به‌طور قابل توجهی باعث افزایش سمیت سلولی و کاهش حیات سلول‌ها شد. همچنین میزان گونه‌های فعال اکسیژن پس از تیمار با سیکلوفسفامید به‌طور چشمگیری افزایش یافت و سطح گلوتاتیون کاهش یافت. در این میان، تزریق پیش درمانی با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

NACتوانست اثرات سایتوتوکسیک سیکلوفسفامید را کاهش و حیات سلولی را افزایش و همچنین میزان ROS را کاهش دهد، در حالی که سطح گلوتاتیون بهبود یافت. نتایج نشان داد که سیکلوفسفامید به دلیل تولید متابولیت‌های سمی مانند آکرولئین، به‌طور قابل توجهی باعث کاهش زنده‌مانی سلولی شد.

سیکلوفسفامید یک داروی آلکیله کننده خوراکی است که در درمان بیماری‌های بدخیم و غیربدخیم کاربرد گسترده دارد، اما با سمیت‌های مهمی مانند سیستیت هموراژیک، سرکوب ایمنی، آلوپسی و در دوزهای بالا سمیت قلبی همراه است. پیشگیری از این عوارض عمدتاً با اصلاح رژیم‌های درمانی انجام می‌شود. با وجود خطر بروز سرطان‌های ثانویه، به‌ویژه در مثانه، سیکلوفسفامید همچنان دارویی مؤثر است و تحقیقات بر مسیرهای فعال‌سازی آن می‌تواند به کاهش عوارض جانبی کمک کند(۲۹). مصرف زیاد داروی سیکلوفسفامید، همانند سایر داروهای، ضد سرطان، به سرعت در سلول‌های در حال تقسیم باعث بروز سمیت سلولی از جمله آسیب‌های استرس اکسیداتیو می‌شود. پاتوژنز سمیت سیکلوفسفامید، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن از متابولی های سیکلوفسفامید است که نقش مهمی در بروز آسیب دارد. سمیت سیکلوفسفامید ناشی از اتصال آکرولئین به نوکلئوفیل‌های آنتی‌اکسیدانی سلولی مانند گلوتاتیون است که منجر به تخلیه سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و همچنین شروع پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود(۳۲ - ۳۰).

آنتی اکسیدان‌هایی مانند NAC به عنوان ابزاری برای بررسی نقش ROS در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و پاتولوژیک استفاده شده است. NAC با مهار مسیرهای سیگنالینگ وابسته به ROS مانند c-Jun وMAPK P38، از فعال‌سازی فاکتورهای التهابی و آپوپتوز جلوگیری می‌کند و بقای سلولی را افزایش می‌دهد. این ترکیب با خاصیت کاهشی خود فعالیت پروتئین‌ها را تغییر داده و در اصلاح DNA و تعدیل فرآیندهای مولکولی نقش دارد. به‌رغم غیر اختصاصی بودن، NAC ارزش درمانی بالایی در کاهش التهاب، فیبروز، اختلال عملکرد اندوتلیال، سم‌زدایی استامینوفن و بهبود طول عمر پیوند نشان می‌دهد(۳۳). در مطالعه Mansour و همکاران در سال ۲۰۱۵ که به بررسی اثر محافظتی NAC بر سمیت قلبی القا شده توسط سیکلوفسفامید در موش‌های صحرایی پرداخته شد، تزریق سیکلوفسفامید موجب افزایش قابل توجه آنزیم‌های سرمی آمینوترانسفرازها، کراتین کیناز (CK)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، فاکتور نکروز توموری-آلفا و کاهش قابل توجه سطح نیترات/نیتریت کل (NOx) گردید. در بافت‌های قلبی نیز باعث افزایش قابل توجه مالون‌دی‌آلدئید و NOx و کاهش قابل توجه محتوای گلوتاتیون احیا شده و فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز شد. تجویز NAC به مدت پنج روز پیش از سیکلوفسفامید تمامی تغییرات بیوشیمیایی القا شده توسط سیکلوفسفامید را کاهش داد و نتایج نشان داد که NACبا مهار استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو و حفظ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سمیت قلبی ناشی از سیکلوفسفامید را تعدیل کرد(۳۴). در سال ۲۰۲۰، Kang و همکاران به مطالعه اثر NAC بر عوارض ناشی از سیکلوفسفامید در خوک‌های مینیاتوری پرداختند. در این پژوهش ۱۵ خوک مینیاتوری به‌عنوان مدل آزمایشی برای ارزیابی اثرات درمان با-N استیل‌سیستئین بر واکنش‌های ایمنی، آسیب کبدی و استرس اکسیداتیو پس از تزریق سیکلوفسفامید استفاده شدند. NAC پس از تزریق سیکلوفسفامید تعداد سلول‌های ایمنی را افزایش داد و تولید TNF-α را کاهش داد، همچنین بیان TNF-α، IFN-γ، NF-κB و IL-8 را کاهش و بیان-IL 10 را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افزایش داد. سطح سرمی آنزیم‌های آلانین ترانس‌آمیناز و آسپارتات ترانس‌آمیناز کاهش یافت، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز افزایش و فعالیت مالون‌دی‌آلدئید

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

کـاهش پیـدا کـرد. بنـابراین، NAC موجـب کـاهش سرکوب ایمنی، آسیب کبـدی و اسـترس اکسـیداتیو در خوک‌هـای مینیـاتوری تحـت چـالش سیکلوفسـفامید می‌شود. این مطالعه نشان می‌دهد کـه -N استیل‌سیسـتئین کاربرد درمانی بالقوه‌ای در دام برای تعدیل واکنش‌های ایمنی، آسیب کبدی و اسـترس اکسـیداتیو دارد(۳۵). در مطالعـه ای دیگـر در سـال ۲۰۲۲، بیـان شـد کـه تجـویز همزمان NAC و ویتامین E توانست به‌طور قابل تـوجهی عوارض جانبی سیکلوفسفامید، به‌ویژه در بافت تخمدان، را کـاهش دهـد(۳۶). در مطالعـه حاضـر نیـز NAC در غلظـت‌هـای متفـاوت در پـیش تیمـار بـا داروی سیکلوفسـفامید، میـزان اسـترس اکسـیداتیو را از طریـق کاهش میزان ROS کاهش داد و همچنین سبب افـزایش سطح گلوتاتیون شد.

در مطالعه بر روی رت های مبتلا به سمیت کبدی و کلیوی القا شـده توسـط سـیس‌پلاتین مشـاهده شـد کـه سیس‌پلاتین با افزایش آنزیم‌های کبدی، اوره، کـراتینین و لیپیدها و کاهش پروتئین، آلبومین و کلسترول، موجب اسـترس اکسـیداتیو (افـزایش MDA و کـاهش GSH، SOD و کاتالاز)، آسیب بافتی و افزایش بیان کاسـپاز-۳ در کبد و کلیه شد. تجویز لیکـوپن و N-استیل‌سیسـتئین به‌طور منفرد یا ترکیبی این تغییرات را تعدیل کرده و اثر محافظتی در برابر سمیت و آپوپتوز ناشی از سیس‌پلاتین نشان داد(۳۷).Kitamura و همکاران در سـال ۲۰۲۱، بـه تحقیق بر روی بیمـاران مبـتلا بـه سـرطان پـس از شـیمی درمانی که ممکن است دچار اختلالات روان‌شـناختی و شناختی شوند پرداختند. در این مطالعـه، نشـان داده شـد که درمان ترکیبی دوکسوروبیسـین و سیکلوفسـفامید در رت‌ها موجـب بـروز رفتارهـای شـبه اضـطرابی، اخـتلال شـناختی و کـاهش نسـبت GSH/GSSG در هیپوکامـپ می‌شود. تجویز NAC این تغییرات را معکـوس کـرده و اثر محافظتی در برابر اختلالات روان‌شـناختی و اسـترس اکسـیداتیو ناشـی از شـیمی درمـانی نشـان داد(۳۸). در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۲۲، مشخص شـد کـه NAC ترکیبی است که توجه فزاینـده‌ای در درمـان اخـتلالات روان‌پزشکی به خود جلب کرده اسـت. NAC عمـدتاً از طریق فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهـابی و تعـدیل گلوتامـات مـورد بررسـی قـرار گرفتـه و در درمـان اختلالات نوروتکاملی، اخـتلالات طیـف اسـکیزوفرنی، اخـتلالات مـرتبط بـا دوقطبـی، اخـتلالات افسـردگی، اضـطراب، اخـتلالات وسـواس-اجبـاری، اخـتلالات مصـرف مـواد، اخـتلالات نوروشـناختی و درد مـزمن مطالعه شده اسـت. اگرچـه شـواهد پیش‌بـالینی و توجیـه نظری کافی برای استفاده از NAC در درمان بسـیاری از اخـــتلالات روان‌پزشـــکی وجـــود دارد، نتـــایج کارآزمایی‌های بالینی در بیش‌تر این اختلالات متنـاقض بـوده اسـت. بـا ایـن حـال، بسـیاری از مطالعـات قـدرت آماری کافی نداشته و احتمالاً مـدت زمـان آن‌هـا بسـیار کوتاه بوده است، به‌طوری‌که برخی شواهد تنهـا پـس از ماه‌ها درمان با NAC مشاهده شـده‌اند. در حـال حاضـر، بیش‌ترین شواهد از اثرات سودمند NAC به‌عنوان درمان کمکـی در علائـم منفـی اسـکیزوفرنی، اوتیسـم شـدید، افسردگی و اختلالات وسواس-اجباری وجود دارد(۳۹). مطالعه حاضر نشـان داد کـه سیکلوفسـفامید بـا تحریـک تولیـد رادیکال‌هـای آزاد و ایجـاد اسـترس اکسـیداتیو، نقش مهمی در بروز سمیت سلولی دارد. ایـن فرآینـد بـه افزایش شاخص‌های اکسیداتیو در سلول هـا منجـر شـد. تجویز NAC توانست به‌طور معنی‌دار سطح فاکتورهـای اسـترس اکسـیداتیو را کـاهش دهـد و اثـر محـافظتی آنتی‌اکسیدانی خود را نشان دهد.

سپاسگزاری

این مقالـه حاصـل پایـان نامـه خـانم رویـا فاختـه از دانشگاه علوم پزشکی مازندران- واحد بین الملل رامسـر می باشد. بنابراین نویسندگان مراتـب تشـکر و قـدردانی خود را از همکاری معاونت پژوهشی در حمایت از ایـن طرح اعلام می دارند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

References

1- D'Oria O, Corrado G, Laganà AS, Chiantera V, Vizza E, Giannini A. New advances in cervical cancer: from bench to bedside. Int J Environ Res Public Health 2022; 19(12): 7094. PMID: 35742364

2- Chargari C, Peignaux K, Escande A, Renard S, Lafond C, Petit A, et al. Radiotherapy of cervical cancer. Cancer Radiother 2022; 26(1-2): 298-308. PMID: 34838422

3- He M, Xia L, Li J. Potential mechanisms of plant-derived natural products in the treatment of cervical cancer. Biomolecules 2021; 11(10): 1539. PMID: 34680175

4- Yi SA, Kim GW, Yoo J, Han JW, Kwon SH. HP1γ sensitizes cervical cancer cells to cisplatin through the suppression of UBE2L3. Int J Mol Sci 2020; 21(17): 5976. PMID: 32825622

5- Doghish AS, Ali MA, Elyan SS, Elrebehy MA, Mohamed HH, Mansour RM, et al. miRNAs role in cervical cancer pathogenesis and targeted therapy: signaling pathways interplay. Pathol Res Pract 2023; 248: 154386. PMID: 37286744

6- Schubert M, Bauerschlag DO, Muallem MZ, Maass N, Alkatout I. Challenges in the diagnosis and individualized treatment of cervical cancer. Medicina (Kaunas) 2023; 59(5): 925. PMID: 37241154

7- Silva GÁF, Nunes RAL, Morale MG, Boccardo E, Aguayo F, Termini L. Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. Clinics (Sao Paulo) 2018; 73(Suppl 1): e548s. PMID: 30378736

8- Choi S, Ismail A, Pappas-Gogos G, Boussios S. HPV and cervical cancer: a review of epidemiology and screening uptake in the UK. Pathogens 2023; 12(2): 298. PMID: 36839554

9- 9. Gomes D, Yaduvanshi S, Silvestre S, Duarte AP, Santos AO, Soares CP, et al. Taxifolin and lucidin as potential E6 protein inhibitors: p53 function re-establishment and apoptosis induction in cervical cancer cells. Cancers (Basel) 2022; 14(12): 2834. PMID: 35740516

10- Ahlmann M, Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. Cancer Chemother Pharmacol 2016; 78(4): 661-671. PMID: 27449657

11- Ogino MH, Tadi P. Cyclophosphamide. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. (No PMID)

12- Pujari SS, Kempen JH, Newcomb CW, Gangaputra S, Daniel E, Suhler EB, et al. Cyclophosphamide for ocular inflammatory diseases. Ophthalmology 2010; 117(2): 356-365. PMID: 19892406

13- Ponticelli C, Escoli R, Moroni G. Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases? Autoimmun Rev 2018; 17(10): 1022-1027. PMID: 30009952

14- Madondo MT, Quinn M, Plebanski M. Low dose cyclophosphamide: mechanisms of T cell modulation. Cancer Treat Rev 2016; 42: 3-9. PMID: 26545350

15- Cui H, Li T, Wang L, Su Y, Xian CJ. Dioscorea bulbifera polysaccharide and cyclophosphamide combination enhances anti-cervical cancer effect and attenuates immunosuppression and oxidative stress in mice. Sci Rep 2016; 6: 19185. PMID: 26754156

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

16- Qi Q, Dong Z, Sun Y, Li S, Zhao Z. Protective effect of bergenin against cyclophosphamide-induced immunosuppression by immunomodulatory effect and antioxidation in Balb/c mice. Molecules 2018; 23(10): 2668. PMID: 30340395

17- Çeribaşi AO, Türk G, Sönmez M, Sakin F, Ateşşahin A. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2010; 107(3): 730-736. PMID: 20444144

18- Gunes S, Sahinturk V, Uslu S, Ayhanci A, Kacar S, Uyar R. Protective effects of selenium on cyclophosphamide-induced oxidative stress and kidney injury. Biol Trace Elem Res 2018; 185(1): 116-123. PMID: 29322264

19- Nafees S, Rashid S, Ali N, Hasan SK, Sultana S. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway. Chem Biol Interact 2015; 231: 98-107. PMID: 25724884

20- Tripathi D, Jena G. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. Chem Biol Interact 2009; 180(3): 398-406. PMID: 19358833

21- Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. Overview on the effects of N-acetylcysteine in neurodegenerative diseases. Molecules 2018; 23(12): 3305. PMID: 30551612

22- Ooi SL, Green R, Pak SC. N-acetylcysteine for the treatment of psychiatric disorders: a review of current evidence. Biomed Res Int 2018; 2018: 2469486. PMID: 30671456

23- Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. Free Radic Res 2018; 52(7): 751-762. PMID: 29587553

24- Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. Expert Opin Biol Ther 2008; 8(12): 1955-1962. PMID: 18990082

25- Tenório MCS, Graciliano NG, Moura FA, Oliveira ACM, Goulart MOF. N-acetylcysteine (NAC): impacts on human health. Antioxidants (Basel) 2021; 10(6): 967. PMID: 34204413

26- Rahmati M, Jourablou S, Gharehkhani 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.

27- 27. Shokrzadeh M, Ataee R, Rahmati Kukandeh M, Alizade Chapi M, Asemi S, Gharehkhani E. Protective effects of hydroalcoholic extract of ginger on DNA damage and viability of PC12 cells exposed to sodium dithionite. J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35(249): 32-44.

28- Kuhestani S, Shokrzadeh M, Aghajanshakeri S, Shokrzadeh S. Protective effects of simvastatin on cytotoxicity and oxidative stress in human gingival fibroblasts cells exposed to venlafaxine. J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31(205): 81-88.

29- Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. Cyclophosphamide toxicity: characterising

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]

and avoiding the problem. Drugs 1991; 42(5): 781-795. PMID: 1723374

30- Oyagbemi AA, Omobowale OT, Asenuga ER, Akinleye AS, Ogunsanwo RO, Saba AB. Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in Wistar rats: the modulatory role of gallic acid as a hepatoprotective and chemopreventive phytochemical. Int J Prev Med 2016; 7: 51. PMID: 27076886

31- Cuce G, Çetinkaya S, Koc T, Esen HH, Limandal C, Balcı T, et al. Chemoprotective effect of vitamin E in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats. Chem Biol Interact 2015; 232: 7-11. PMID: 25797103

32- Temel Y, Kucukler S, Yıldırım S, Caglayan C, Kandemir FM. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2020; 393(3): 325-337. PMID: 31720701

33- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci 2003; 60(1): 6-20. PMID: 12613655

34- Mansour HH, Hasan HF. Protective effect of N-acetylcysteine on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. Environ Toxicol Pharmacol 2015; 40(2): 417-422. PMID: 26233864

35- Kang KS, Shin S, Lee SI. N-acetylcysteine modulates cyclophosphamide-induced immunosuppression, liver injury, and oxidative stress in miniature pigs. J Anim Sci Technol 2020; 62(3): 348-360. PMID: 32568305

36- Raeeszadeh M, Saleh Hosseini SM, Amiri AA. Impact of co administration of N acetylcysteine and vitamin E on cyclophosphamide induced ovarian toxicity in female rats. J Toxicol 2022; 2022: 9073405. PMID: 35645642

37- 37. Elsayed A, Elkomy A, Elkammar R, Youssef G, Abdelhiee EY, Abdo W, et al. Synergistic protective effects of lycopene and N-acetylcysteine against cisplatin-induced hepatorenal toxicity in rats. Sci Rep 2021; 11(1): 13979. PMID: 34234159

38- Kitamura Y, Ushio S, Sumiyoshi Y, Wada Y, Miyazaki I, Asanuma M, et al. N-acetylcysteine attenuates the anxiety-like behavior and spatial cognition impairment induced by doxorubicin and cyclophosphamide combination treatment in rats. Pharmacology 2021; 106(5-6): 286-293. PMID: 33486498

39- Bradlow RCJ, Berk M, Kalivas PW, Back SE, Kanaan RA. The potential of N-acetyl-L-cysteine (NAC) in the treatment of psychiatric disorders. CNS Drugs 2022; 36(5): 451-482. PMID: 35412212

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-02]