BRIEF REPORT

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

Ali Mandegari[1,2],
Azadeh Gholami-Javadie[3],
Mandana Jafari[1],
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 μM could not reduce the viability of the cultured cells below 50%, its use in combination with cimetidine or famotidine at 25 μM 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)

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۷۰ اسفند سال ۱۳۹۷ (۱۸۵-۱۸۰)

# 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 کارآیی و تحمل‌پذیری و کاهش اثرات جانبی و مقاومت دارویی است. اخیراً، خواص ضد سرطانی آنتاگونیست‌های 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 رده‌های سلولی سرطانی انسانی A549، MCF-7 و HT-29 بود.

**مواد و روش‌ها:** سمیت سلولی سایمتیدین و فاموتیدین به تنهایی و در ترکیب با DOX با استفاده از آزمون MTT پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته تعیین شد.

**یافته‌ها:** استفاده همزمان از H2-بلوکرها با DOX منجر به افزایش سمیت در سلول‌های مورد مطالعه شد. در حالی که DOX در غلظت ۱ میکرومولار قادر به کاهش زنده مانی سلول‌های کشت شده به زیر ۵۰ درصد نبود، استفاده از آن در ترکیب با سایمتیدین یا فاموتیدین ۲۵ میکرومولار باعث کاهش درصد سلول‌های زنده به زیر ۵۰ درصد شد.

**استنتاج:** تجویز همزمان سایمتیدین/ فاموتیدین با DOX می‌تواند کاندیدی برای شیمی درمانی باشد.

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

## مقدمه

امروزه درمان سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر، به یکی از چالش‌های سیستم پزشکی در جهان تبدیل شده است(۱). سرطان پستان، ریه و کولورکتال از شایع‌ترین سرطان‌ها هستند که آمار ابتلا به آن‌ها در ایران نیز رو به افزایش است(۳،۲). یکی از درمان‌های رایج انواع سرطان‌ها، شیمی درمانی با داروهایی مانند دوکسوروبیسین است که در تعدادی از بیماران، مقاومت به آن بروز می‌کند(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 می‌شود(۵).

**مولف مسئول: صالحه صبوری**- کرمان: بلوار هفت باغ علوی، پردیس دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی E-mail: ssabouri@kmu.ac.ir
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

بنابراین، تاکنون مطالعاتی صورت گرفته که به نحوی بر این مسائل فائق آیند از جمله استفاده از RNA مداخله‌گر کوچک (siRNA) برای خاموش کردن ژن تولیدکننده پروتئین خارج‌کننده دوکسوروبیسین 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 ($H_2$) 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 پیش بالینی، فراتر نرفت. اما تاکنون نه تنها شاهدی بر این اثر از سایمتیدین و سایر مهارکننده‌های گیرنده $H_2$ 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 دوکسوروبیسین بر روی رده‌های سلولی سرطانی پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

برای این مطالعه، رده های 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 $CO_2$ 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 $۱\times۱۰^۴$ و از رده سلولی HT-29 تعداد $۱/۳\times۱۰^۴$ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل، در پلیت های ۹۶ خانه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط مذکور، غلظت‌های مختلف فاموتیدین (Wuasavaa phrmaceutical، India) و سایمتیدین (Wuxi kaili pharmaceutical، China) 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 دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر معرف MTT (5 mg/mL) به خانه ها 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 $IC_{50}$ داروها، دو غلظت کم‌تر از $IC_{50}$ فاموتیدین و سایمتیدین (۵ و ۲۵ میکرومولار) در ترکیب با دو غلظت کم‌تر از $IC_{50}$ دوکسوروبیسین (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

قرار گرفت. میزان $IC_{50}$ با تست probit نرم‌افزار 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 شماره۱:** مقادیر $IC_{50}$ محاسبه شده سایمتیدین و فاموتیدین بر روی رده های سلولی A549، MCF7 و HT-29. مقادیر به صورت mean± S.E.M گزارش شده است

| نام دارو | مقدار $IC_{50}$ محاسبه شده (µM) | | |
|---|---|---|---|
| | A549 | MCF7 | HT-29 |
| سایمتیدین | ۱۵۷/۷۱±۱۸/۴۴ | ۱۳۸/۰۵±۱۷/۳۶ | ۲۰۷/۰۱±۲۷/۸۲ |
| فاموتیدین | ۱۵۹/۸۵±۲۸/۰۳ | ۱۶۵/۷۹±۲۳/۳۱ | ۲۶۵/۳۴±۳۴/۹۲ |
| دوکسوروبیسین | ۶/۲۴±۰/۳۸ | ۴/۹۷±۰/۱۸ | ۶/۰۲±۰/۱۸ |

نتایج به‌دست 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 به‌طوری‌که 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 سلول های 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 مهارکننده های $H_2$ 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 ضدآپوپتوز) 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 کلانژیوکارسینوما (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،

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 سیالیل لوئیس (sialyl Lewis) 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 (اینترفرون آلفا، سایمتیدین، ملوکسیکام و کندزارتان یا پراپندوپریل) 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 پایان نامه دکترای داروسازی است. نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان برای تأمین هزینه ها و حمایت مالی (طرح شماره ۹۴۰۳۱۶) کمال تشکر را دارند. این طرح با کد اخلاق IR.KMU.REC.1394.259 در دانشگاه علوم پزشکی کرمان پذیرفته شده است.

## 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. Cytotoxity 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 $H_2$ 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, Vaeteewoottacharn 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.