

## *Pretreatment with Cilostazol Attenuates Carboplatin Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Bronchial Epithelial Cells (Beas-2B) and Human Blood Lymphocytes*

Mohammad Shokrzadeh<sup>1</sup>

Mahboube Rahmati<sup>2</sup>

Elahe Gharekhani<sup>2</sup>

Rouzbeh Zare<sup>2</sup>

Parsa Pourmohammadi<sup>3</sup>

Shaghayegh Aghajanshakeri<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> PhD in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

<sup>4</sup> Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 29, 2023 ; Accepted November 28, 2023)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Cilostazol is a prescription medication for intermittent claudication in patients with peripheral artery disease. Previous research has demonstrated that this 2-oxoquinoline derivative possesses antithrombotic, vasodilator, antimutagenic, and antioxidant effects. Cilostazol exerts its products through the inhibition of PDE3 activity and the prevention of cAMP degradation. The present study aimed to examine the protective properties of cilostazol against carboplatin-induced cytotoxicity and genotoxicity in Beas-2B and human blood lymphocyte cells.

**Materials and methods:** cells were pre-treated with different concentrations of cilostazol (5, 25, 50, and 100  $\mu$ M) with carboplatin at an optimum cytotoxic dosage (9.2  $\mu$ M). The MTT and micronucleus assays were used to assess cytotoxicity and genotoxicity. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA in Prism Ver. 8 software.

**Results:** The cytotoxic effect of carboplatin was dose-dependent, as evidenced by the 48h culture treatment with concentrations of 0.3, 1, 3, 10, and 30  $\mu$ M. Pre-treatment of cilostazol at 25, 50, and 100  $\mu$ M with carboplatin at 9.2  $\mu$ M enhanced cell viability in Beas-2B cells compared to the carboplatin alone as positive control. Additionally, cilostazol at 50 and 100  $\mu$ M showed its potent genoprotective effects via micronucleus assay against carboplatin at IC<sub>50</sub> at blood lymphocyte cells.

**Conclusion:** Cilostazol provided conceivable protective effects by modulating cytotoxicity and genotoxicity induced by carboplatin in Beas-2B and human blood lymphocyte cells.

**Keywords:** cilostazol, carboplatin, micronucleus assay, cytotoxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (227): 24-36 (Persian).

**Corresponding Author:** Shaghayegh Aghajanshakeri - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: Shaghayegh.aghajanshakeri@gmail.com)

# پیش درمانی با سیلواستازول بر سمیت سلولی و ژنتیکی ناشی از کربوپلاتین در سلول‌های اپیتلیال برونش [Beas-2B] و لنفوسیت‌های خون انسانی

محمد شکرزاده<sup>۱</sup>محبوبه رحمتی<sup>۲</sup>الهه قره خانی<sup>۲</sup>روزبه زارع<sup>۲</sup>پارسا پورمحمدی<sup>۳</sup>شقایق آقاچان شاکری<sup>۴و۲</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** سیلواستازول دارویی است که جهت درمان لنگش متناوب در بیماران مبتلا به بیماری‌های عروق محیطی استفاده می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده است که این دارو یک مشتق اکسی کینولون با اثرات ضد ترومبوتیک، گشادکننده عروق، آنتی‌میتوژنیک و آنتی‌اکسیدانی است. سیلواستازول اثرات خود را از طریق مهار فعالیت فسفو دی استراز ۳ و جلوگیری از تخریب cAMP اعمال می‌کند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات محافظتی سیلواستازول در برابر سمیت سلولی و ژنتیکی ناشی از کربوپلاتین در سلول‌های نرمال ریه و لنفوسیت‌های خونی انسان انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، سلول‌های مورد مطالعه با غلظت‌های مختلف سیلواستازول (۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) با کربوپلاتین در دوز بهینه القاکنندگی سمیت (۹/۲ میکرومولار) پیش درمانی شدند. سمیت سلولی و سمیت ژنتیکی با استفاده از روش میکرونوکلئوس و MTT، مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه در نرم‌افزار Prism ورژن ۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** اثرات سیتوتوکسیک کربوپلاتین در انکوباسیون ۴۸ ساعته با غلظت‌های ۰/۳، ۱، ۳، ۱۰ و ۳۰ میکرومولار به صورت وابسته به دوز مشخص شد. پیش درمانی سیلواستازول در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار با کربوپلاتین ۹/۲ میکرومولار به طور قابل توجهی زنده‌مانی سلول‌های نرمال ریوی را در مقایسه با کربوپلاتین به تنهایی به عنوان گروه کنترل مثبت افزایش داد. به علاوه، سیلواستازول در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اثرات محافظتی ژنتیکی خود را از طریق سنجش میکرونوکلئوس در برابر کربوپلاتین در غلظت IC<sub>50</sub> در لنفوسیت‌های خونی نشان داد.

**استنتاج:** سیلواستازول با تعدیل سمیت سلولی و ژنتیکی ناشی از کربوپلاتین در سلول‌های نرمال ریوی (Beas-2B) و لنفوسیت‌های خون انسان، اثرات محافظتی قابل ملاحظه‌ای را از خود نشان داده است.

**واژه های کلیدی:** سیلواستازول، کربوپلاتین، سنجش میکرونوکلئوس، سمیت سلولی

## مقدمه

کربوپلاتین با نام تجاری Paraplatin یک داروی شیمی درمانی است که متعلق به عوامل ضد نوپلاستیک پلاتین بر پلاتین است. یک مشتق از نسل دوم سیس پلاتین که برای عملکرد مشابه اما با سمیت کم تر طراحی شده است که متعلق به عوامل ضد نوپلاستیک

E-mail: Shaghayegh.aghajanshakeri@gmail.com

**مؤلف مسئول - شقایق آقاچان شاکری - ساری:** دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی

۱. استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دکترای تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

۴. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۸/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۹/۷

شده است. کربوپلاتین با تشکیل پیوندهای متقابل DNA، در همانندسازی DNA اختلال ایجاد می‌کند و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود. این دارو معمولاً در درمان سرطان‌های مختلف از جمله سرطان تخمدان، ریه، سر و گردن و بیضه استفاده می‌گردد. عوارض جانبی رایج این دارو شامل کاهش سلول‌های خونی، حالت تهوع و اختلالات آب و الکترولیت می‌باشد. اثرات سیتوتوکسیک کربوپلاتین به‌عنوان یک عارضه جانبی به توانایی دارو در آسیب رساندن یا تخریب سلول‌های سرطانی و سالم اشاره دارد. شایع‌ترین سلول‌هایی که تحت تأثیر اثر سیتوتوکسیک کربوپلاتین قرار می‌گیرند، سلول‌هایی هستند که به سرعت تقسیم می‌شوند، که می‌توان از سلول‌های موجود در مغز استخوان، فولیکول‌های مو و پوشش دستگاه گوارش، نام برد. در نتیجه، بیماران ممکن است عوارض جانبی مانند کاهش تعداد سلول‌های خونی (منجر به کم‌خونی، افزایش خطر عفونت و خونریزی)، ریزش مو و مشکلات گوارشی مانند تهوع، استفراغ و اسهال را تجربه کنند (۱-۴). کربوپلاتین مانند سیس‌پلاتین فعالیت ضد توموری خود را از طریق ترکیب و تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در تعامل با DNA سلول‌های سرطانی اعمال می‌کند و ترکیب‌های Pt-DNA را تشکیل می‌دهد که منجر به آپوپتوز می‌شود (۵). به‌طور خاص، کربوپلاتین با انتشار غیر فعال وارد سلول می‌شود و تحت هیدرولیز قرار می‌گیرد و با بازهای پورین نوکلئوفیل در رشته DNA تعامل می‌کند و در نتیجه پیوندهای متقاطع درون رشته‌ای اصلی و پیوندهای متقابل بین رشته‌ای جزئی تشکیل می‌دهد. متعاقباً، پیوندهای متقاطع فرآیند تکثیر DNA را مهار می‌کنند و باعث ایجاد خطا در رونویسی می‌شوند (۶). مکانیسم اثر کربوپلاتین به‌صورت برهمکنش کربوپلاتین با DNA به منظور ایجاد ترکیبات اضافی DNA واسطه و در واقع ایجاد سمیت ژنتیکی می‌باشد. این دارو با اعمال سمیت ژنتیکی بر سلول‌های سرطانی از طریق پیوندهای متقاطع DNA کربوپلاتین با DNA تک، بین رشته‌ای و

درون رشته‌ای است که چرخه سلولی را در فازهای S، G1 یا G2-M متوقف می‌کند. این فرآیند منجر به شکست در ترمیم و میتوز نابجای سلول‌ها و به‌دنبال آن مرگ سلولی می‌گردد (۸،۷). سمیت ژنتیکی در سلول‌ها به ظرفیت یک ماده جهت ایجاد آسیب‌های ژنتیکی، مانند جهش، انحرافات کروموزومی، یا شکستن رشته DNA اشاره دارد که می‌تواند منجر به اثرات نامطلوب سلامتی، از جمله سرطان و بیماری‌های ارثی شود. این آسیب ممکن است به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق تشکیل متابولیت‌های فعال یا تداخل با فرآیندهای سلولی درگیر در ترمیم و تکثیر DNA رخ دهد. سنجش‌های سمیت ژنتیکی جهت ارزیابی ایمنی داروها، مواد شیمیایی و عوامل محیطی ضروری است (۹). سنجش میکرونوکلئوس می‌تواند اثرات کلاستوژنیک (القای شکست کروموزوم) و آنوژنیک (باعث از دست دادن کل کروموزوم) را شناسایی کند و آن را به ابزاری جامع جهت ارزیابی پتانسیل ژنوتوکسیک تبدیل کند. تشخیص و تعیین در این تست کمیت ریز هسته‌ها است، که هسته‌های کوچک و اضافی هستند که در طول تقسیم سلولی زمانی که کروموزوم‌ها یا قطعات کروموزوم در هسته‌های دختر گنجانده نمی‌شوند، تشکیل می‌شوند. این ریز هسته‌ها نشان‌دهنده آسیب‌های ژنتیکی مانند شکستگی کروموزومی یا از دست دادن کل کروموزوم هستند و با استفاده از تکنیک‌های مختلف رنگ‌آمیزی زیر میکروسکوپ قابل مشاهده و شمارش می‌باشند. سنجش میکرونوکلئوس ابزاری حساس و قابل اعتماد برای ارزیابی پتانسیل ژنوتوکسیک مواد شیمیایی، دارویی و عوامل محیطی در شرایط آزمایشگاهی است. این سنجش را می‌توان با استفاده از انواع مختلف سلول، مانند لنفوسیت‌های انسانی، رده‌های سلولی، یا سایر سلول‌های پستانداران انجام داد (۱۰). سیلوستازول یک مشتق اکسی‌کینولون است که با نام تجاری Pletal به بازار عرضه می‌شود (۱۱). یک مهارکننده انتخابی فسفودی استراز نوع ۳ (PDE-3)، یک داروی ضد

طبیعی انسان (Beas-2B) از بانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک خریداری شد. رده سلولی نرمال با محیط کشت DMEM:F12 (Biosera) و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Biosera) FBS در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شد. جهت انجام تست‌های مختلف، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین-اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (Biosera) (Trypsin EDTA (0.025%)) از ته فلاسک جدا شده و در دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده مانده سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین گردید (۲۱).

#### تست سمیت سلولی به روش MTT

سنجش رنگ تترازولیوم یا MTT به‌عنوان شاخصی جهت ارزیابی سمیت سلولی کربوپلاتین و اثرات محافظتی سلولی سیلوستازول در پیش‌درمانی با کربوپلاتین بر سلول‌های نرمال ریوی انجام شد. روش MTT یک روش کمی اسپکتروفتومتری است که طی آن نمک تترازولیوم که در محیط کشت فاقد فنول رد یا بافر PBS آماده‌سازی می‌شود، محلول زرد رنگی ایجاد می‌کند که توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال احیا شده و به کریستال‌های نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شوند. سلول‌های Beas-2B در پلیت‌های ۹۶ خانه با تعداد ۱×۱۰<sup>۴</sup> سلول در هر چاهک کاشته شدند و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. سپس در شرایط پیش‌درمانی، سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار سیلوستازول مواجهه و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدد با داروی کربوپلاتین در غلظت IC<sub>50</sub> معادل ۹/۲ میکرومولار مواجه شدند (۲۲). در ادامه، سلول‌ها با محلول MTT (با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم

پلاکت و گشادکننده عروق است که از نظر بالینی در درمان انسداد شریانی مزمن و لنگی متناوب و همچنین برای پیشگیری از سکنه مغزی ایسکمیک استفاده می‌شود (۱۵-۱۲). سیلوستازول با مهار آنزیم فسفودی استراز ۳ که منجر به افزایش آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) در پلاکت‌ها و دیواره رگ‌های خونی می‌شود، عمل می‌کند. این افزایش cAMP به جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها و افزایش اتساع عروق کمک می‌کند، در نتیجه جریان خون را بهبود می‌بخشد و علائم لنگش متناوب را کاهش می‌دهد (۱۶، ۱۷). سیلوستازول از سلول‌ها در برابر سمیت سلولی اندوتلیال ناشی از TNF- $\alpha$  از طریق یک مسیر وابسته به PPAR- $\gamma$  محافظت می‌کند (۱۸). این ترکیب یک آنتی‌اکسیدانت و یک ژنوپروتکتیو قوی نیز شناخته شده است. سیلوستازول می‌تواند از آسیب کروموزومی ناشی از متوترکسات بدون تعدیل سمیت سلولی ناشی از متوترکسات جلوگیری کند (۱۹). سیلوستازول با فعال کردن سیستم‌های دفاعی اکسیداتیو از طریق افزایش بیان فسفواینوزیتید ۳ کیناز/ پروتئین کیناز (PI3K/Akt) B و mRNA های مرتبط با فاکتور هسته‌ای اریتروئید ۲ هم اکسیژناز-۱ (Nrf2/HO-1) از استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند و منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و ترمیم اختلال عملکرد میتوکندری می‌شود (۲۰). علاوه بر نقش اساسی سیلوستازول به عنوان یک داروی ضد پلاکت، مطالعه حاضر بر اثرات محافظت سلولی و ژنتیکی این دارو بر رده‌های سلولی مدل نرمال ریوی (Beas-2B) و لنفوسیت‌های خونی انسان با القای سمیت ناشی از کربوپلاتین پرداخته است.

## مواد و روش‌ها

### کشت سلولی

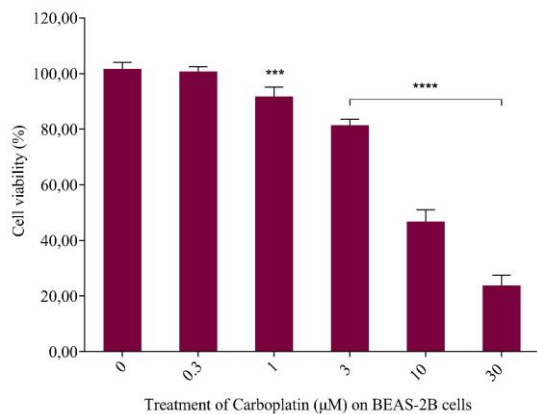
مطالعه تجربی حاضر، پس از تایید کمیته اخلاق در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد اخلاق: IR.MAZUMS.3.REC.1401.13975) صورت گرفت. سلول‌های اپیتلیال جدا شده از اپیتلیوم برونش

بر میلی لیتر در هر چاهک) در فسفات بافر سالین (PBS) مواجه شدند و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. پس از خارج نمودن محتویات هر چاهک، بلورهای فورمازان با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفو کساید (DMSO) پراکنده شدند. در نهایت میزان جذب نوری کریستال‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید (۲۳).

#### تست سمیت ژنتیکی به روش میکرونوکلئوس

با استفاده از سرنگ آغشته به هپارین و تحت شرایط استریل، ۵ میلی لیتر نمونه خون وریدی از یک فرد سالم، بدون بیماری، غیر سیگاری و الکلی تهیه گردید. بلافاصله پس از خونگیری به جهت جلوگیری از انعقاد خون، سرنگ به آرامی تکان داده شد تا هپارین موجود در آن به طور یکنواخت با خون مخلوط گردد. نمونه خونی زیر هود و تحت شرایط کاملاً استریل قرار گرفت. نمونه خونی گرفته شده از داوطلب به گروه‌های مجزای یک میلی لیتری در پلیت‌های شش خانه تقسیم شد و با محیط کشت DMEM (حاوی ۰/۷ میلی لیتر سرم FCS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک) به حجم نهایی ۵ میلی لیتر رسید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت و به آن به میزان تقریباً ۰/۱ میلی لیتر ماده میتوزن فیتوهم‌آگلوتینین (PHA) جهت تحریک رشد لنفوسیت‌ها افزوده شد (۲۴). سپس نمونه‌های خونی با سیلوستازول در غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت و کربوپلاتین در غلظت ۹/۲ میکرومولار به مدت ۱ ساعت مواجه گردید. ظرف‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بعد از ۴۴ ساعت، ۶ میکروگرم بر میلی لیتر سیتوکالازین B جهت تحریک هسته لنفوسیت‌ها به تقسیم شدن بدون تقسیم سلول اضافه گردید. ۷۲ ساعت پس از کشت لنفوسیت‌ها محصول برداری صورت گرفت. محتویات ظروف کشت به کمک پیت پاستور به لوله سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۸ دقیقه با دور rpm ۸۰۰ سانتریفیوژ

گردید. سپس مایع فوقانی به آرامی خارج شد به طوری که حدود ۱ میلی لیتر ته لوله دست نخورده باقی ماند. به محتویات ته لوله که شامل مقداری از محیط کشت باقی مانده و پلت سلولی می‌باشد ۶ میلی لیتر محلول هیپوتونیک پتاسیم کلراید افزوده شد و با استفاده از پیت پاستور پلاستیکی ۳-۲ بار جابجا پیتاژ صورت گرفت. بلافاصله پس از افزودن پتاسیم کلراید (KCl) نمونه‌ها با دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه توسط پیت پاستور به آرامی مایع فوقانی برداشته شد به طوری که در حدود ۱ میلی لیتر ته لوله دست نخورده باقی ماند. جهت تثبیت سلول‌ها، ۲ میلی لیتر از محلول ثابت کننده سرد را قطره قطره به نمونه افزوده و سپس حجم نهایی نمونه با استفاده از این محلول به ۹ میلی لیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها با دور rpm ۸۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول بالایی آن خارج گردید. این عمل به صورت پیاپی (حداقل ۳ بار) و تا زمانی که محلول رویی سلول‌ها شفاف و بی‌رنگ نماید ادامه پیدا کرد و در آخرین مرحله پس از سانتریفیوژ محلول بالایی به میزانی که ته مانده لوله سانتریفیوژ فقط ۰/۵ میلی لیتر باشد و یک محلول سوسپانسیون یکنواخت به دست آید. جهت بهتر فیکس شدن سلول‌ها، تمامی نمونه‌ها ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. در نهایت از فاصله ۱۰ سانتی‌متری ۳ قطره از سوسپانسیون سلولی را بر روی هر لام ریخته و لام‌ها را کمی سر و ته کرده تا حداکثر سلول‌ها بر روی لام‌ها باقی بمانند، بعد آن‌ها را در دمای اتاق قرار داده تا کاملاً خشک شوند. بهتر است جهت بهتر پخش شدن سلول‌ها، لام‌ها از قبل در فریزر نگهداری شوند. ۳-۲ روز پس از تهیه لام‌ها رنگ آمیزی صورت گرفت. از روش رنگ آمیزی با گیمسا استفاده شد. لام‌ها به صورت منظم با بزرگنمایی ۴۰× میکروسکوپ مورد جستجو قرار گرفت و به ازای هر نمونه حداقل ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای و تعداد ریز هسته‌های موجود در آن شمارش گردید. درصد بروز ریز هسته نشان‌دهنده میزان آسیب



نمودار شماره ۱: حیات سلول‌های نرمال ریوی (Beas-2B) پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض کربوپلاتین در در غلظت‌های ۰، ۰/۳، ۱، ۳، ۱۰ و ۳۰ میکرومولار. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (سه آزمایش مستقل) ارائه شده است. کربوپلاتین در غلظت ۰/۳، ۱، ۳، ۱۰ و ۳۰ میکرومولار در ایجاد سمیت سلولی نسبت به گروه تریت نشده (کنترل منفی) معنادار می‌باشد ( $P < 0/001$ ).

اثرات سیلواستازول در پیش‌درمانی با کربوپلاتین بر رشد سلول‌های نرمال ریوی (Beas-2B)

با افزایش غلظت سیلواستازول در نمودار شماره ۲، حیات و درصد زنده مانی سلول‌های نرمال ریوی افزایش پیدا کرده است. به طوری که میانگین حیات سلول‌های نرمال ریوی از ۵۲/۳۷ درصد در مواجهه سیلواستازول در غلظت ۵ میکرومولار به همراه کربوپلاتین به ۸۲/۲۵ درصد نسبت به گروه کربوپلاتین به تنهایی در غلظت ۹/۲ میکرومولار به عنوان کنترل مثبت رسیده است. از لحاظ مقایسه آماری در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار سیلواستازول به همراه کربوپلاتین نسبت به گروه کربوپلاتین به تنهایی در مهار سمیت سلولی ناشی از کربوپلاتین با معناداری همراه بوده است ( $P < 0/01$ ).

اما در این بین پیش‌درمانی با غلظت ۵ میکرومولار از سیلواستازول تفاوت معناداری با کربوپلاتین به عنوان گروه کنترل مثبت نداشته است. در مقایسه با گروه کنترل منفی گروه تریت با کربوپلاتین اختلاف معنی‌داری را در القا سایتوتوکسیسیته در سلول‌های نرمال نشان داده است ( $P < 0/001$ ).

ژنتیکی و میزان کاهش آن معیار کاهش آسیب ژنتیکی گروه مربوطه می‌باشد (۲۵).

روش آماری

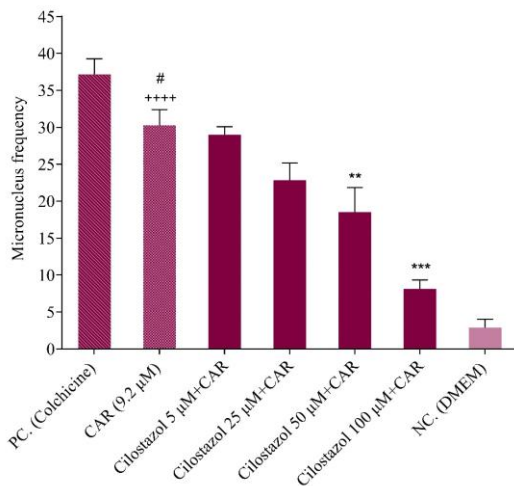
کلیه داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. در این مطالعه پس از تعیین میانگین نمونه‌ها، با استفاده از نرم افزار آماری Prism Ver.8 و آزمون One Way ANOVA و (post test: Tukey) مقادیر مختلف میانگین‌ها با هم مقایسه شد و ( $P < 0/05$ ) به عنوان مبنای معنی‌داری در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

اثرات کربوپلاتین بر رشد سلول‌های نرمال ریوی (Beas-2B)

همان‌طور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است، سنجش بقای سلولی با هدف یافتن غلظت ۵۰ درصدی مهار رشد ( $IC_{50}$ ) کربوپلاتین در مواجهه با سلول‌های نرمال ریوی انجام شد. بررسی سمیت سلولی ناشی از کربوپلاتین در طیف وسیع غلظتی، جهت یافتن غلظت اپتیمم در تست‌های بعدی و معنی‌داری اثر بخشی سیلواستازول طراحی گردید. درک خواص دارویی و بیولوژیکی مواد درمانی به تعیین (۵۰ درصد) غلظت بازدارنده ( $IC_{50}$ ) بستگی دارد.  $IC_{50}$  دوز غلظت بهینه بدون اثرات حاد و غیر سمی است. سلول‌های Beas-2B با غلظت‌های ۰/۳، ۱، ۳، ۱۰ و ۳۰ میکرومولار کربوپلاتین به مدت ۴۸ ساعت مواجه شدند. سمیت سلولی وابسته به دوز با کربوپلاتین مشاهده شد. زنده مانی سلول‌های نرمال ریوی پس از ۴۸ ساعت مواجهه از ۱۰۰ درصد در غلظت ۰/۳ میکرومولار به ۲۳/۷۸ درصد در غلظت ۳۰ میکرومولار کاهش پیدا کرده است. بر اساس آنالیزهای صورت گرفته جهت تعیین میزان  $IC_{50}$  با استفاده از نرم‌افزار آماری prism ver.8 میزان  $IC_{50}$  برابر  $9/26 \pm 0/96$  به دست آمده است. این غلظت به عنوان غلظت بهینه کربوپلاتین در تست‌های بعدی انتخاب گردید.

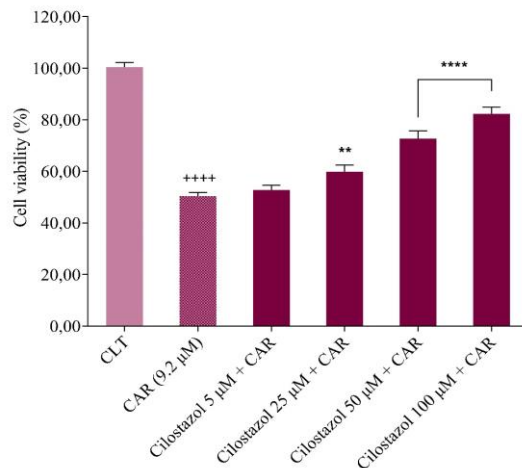
تنهایی در غلظت  $IC_{50}$  تفاوت معناداری در القا آسیب به محتوای ژنتیکی در سلول‌های لنفوسیت خونی در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی (سوسپانسیون سلولی به همراه محیط کشت) و کنترل مثبت (کلشی سین) نشان داده است ( $P < 0/0001$ )، ( $P < 0/05$ ).



نمودار شماره ۳: اثرات سیلوستازول در غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در پیش‌درمانی با داروی کربوپلاتین در غلظت  $IC_{50}$  معادل ۹/۲ میکرومولار بر سلول‌های لنفوسیت خون در تست میکرونوکلئوس. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (سه آزمایش مستقل) ارائه شده است.

## بحث

در مطالعه حاضر کشت سلولی، اثرات محافظتی سیلوستازول بر سمیت سلولی و ژنتیکی ناشی از کربوپلاتین در رده سلولی نرمال ریوی (Beas-2B) در تست MTT و بر سلول‌های لنفوسیت خونی در تست میکرونوکلئوس بررسی گردید. سیلوستازول با تعدیل سمیت سلولی و ژنتیکی ناشی از کربوپلاتین در سلول‌های نرمال ریوی (Beas-2B) و لنفوسیت‌های خون انسان، اثرات محافظتی قابل ملاحظه‌ای را از خود نشان داده است. کربوپلاتین یک آنالوگ پلاتین نسل دوم و یک کمپلکس پلاتینی سیتوتوکسیک است که از نظر ساختاری مرتبط با سیس پلاتین و در مطالعات آزمایشگاهی فعالیت ضد توموری کربوپلاتین از نظر کیفی مشابه



نمودار شماره ۲: اثرات سیلوستازول در غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در پیش‌درمانی با داروی کربوپلاتین در غلظت  $IC_{50}$  معادل ۹/۲ میکرومولار بر رشد سلول‌های نرمال ریوی (Beas-2B). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (سه آزمایش مستقل) ارائه شده است.

اثرات سیلوستازول در پیش‌درمانی با کربوپلاتین بر سلول‌های لنفوسیت خون در تست میکرونوکلئوس

بر اساس نمودار شماره ۳ پیش‌درمانی سیلوستازول در غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به همراه کربوپلاتین در غلظت ژنوتوکسیک معادل ۹/۲ میکرومولار، میانگین تولید میکرونوکلئوس‌های هسته را در سلول‌های لنفوسیت خونی به‌طور معنی‌داری کاهش داده است. اثرات ژنوتوکسیکو قوی از خود نشان داده است. به‌طوری که میانگین ذرات هسته‌ای از ۲۸ در غلظت ۵ میکرومولار سیلوستازول به ۸ عدد ریز هسته در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سیلوستازول به همراه کربوپلاتین رسیده است. با نظر به مقایسه آماری، غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از سیلوستازول به همراه کربوپلاتین تفاوت معنی‌داری در کاهش تعداد ریز هسته‌ها با گروه کربوپلاتین به تنهایی در غلظت  $IC_{50}$  داشته است ( $P < 0/0001$ )، ( $P < 0/01$ ). در این بین غلظت‌های ۵ و ۲۵ میکرومولار سیلوستازول با کربوپلاتین، تفاوت معنی‌داری با کربوپلاتین به تنهایی در کاهش سمیت ژنی نشان نداده است. گروه درمانی کربوپلاتین به

دارو در درمان ترکیبی در دوزهای ۱۰ و ۲۵ میکرومولار در سلول‌های H460 به مدت ۲۴ ساعت هم افزایی نشان داده‌اند (۲۸). در سال ۲۰۱۷، Souza و همکاران اثرات جهش‌زایی مرتبط با کربوپلاتین و اگزالی پلاتین را در سلول‌های تخمدان همستر چینی (اپیتلیال) مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که کربوپلاتین و اگزالی پلاتین به‌طور قابل توجهی فرکانس ریزهسته‌ها (MN)، پل‌های هسته‌ای پلاسماتیک (NPBs)، و جوانه‌های هسته‌ای (NBUDs) را افزایش دادند. اگزالی پلاتین در غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ میکرومولار ناهنجاری‌های کروموزومی قابل توجهی نسبت به کربوپلاتین ایجاد می‌کند. از سوی دیگر، کربوپلاتین، در سلول‌هایی که در معرض غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار قرار دارند، در القای رویدادهای بی‌ثباتی کروموزومی از اگزالی پلاتین کارآمدتر است (۲۹).

Azab و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی پتانسیل ژنوتوکسیک سیس پلاتین و کربوپلاتین به‌عنوان بخش جدایی‌ناپذیر بسیاری از رژیم‌های درمان ضد نوپلاستیک با استفاده از سنجش انحرافات کروموزومی (CAs) و تبادل کروماتیدهای خواهری (SCE) در لنفوسیت‌های انسانی کشت شده پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که سیس پلاتین و کربوپلاتین افزایش معنی‌داری در CA و SCE در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کردند. سطوح CAهای القا شده در هر دو دارو مشابه بود. با توجه به شاخص‌های میتوزی و پروليفراتیو، هر دو داروی سیس پلاتین و کربوپلاتین به‌طور معنی‌داری شاخص میتوزی را کاهش دادند بدون این که بر شاخص پروليفراتیو تأثیر بگذارند (۳۰).

مطالعه حاضر با نتایج مطالعات ذکر شده جهت توکسیک بودن داروی کربوپلاتین در رده سلولی مدل همخوانی دارد. در سال ۲۰۲۲، در پژوهش Basit و همکاران، پیش‌تیمار با کریزین به‌طور قابل توجهی سطح آسیب DNA ناشی از کربوپلاتین را به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی قوی کاهش داد. در این

سیس پلاتین می‌باشد. کربوپلاتین با جایگاه‌های نوکلئوفیل بر روی DNA واکنش می‌دهد و باعث ایجاد پیوندهای عرضی درون رشته‌ای و بین رشته‌ای می‌گردد (۲۶). در مقایسه با سیس پلاتین، بزرگ‌ترین مزیت کربوپلاتین کاهش عوارض جانبی آن، به ویژه از بین بردن اثرات نفروتوکسیک است. اصلی‌ترین عارضه جانبی با این دارو اثر بر سلول‌های خونی است، به‌طوری‌که تولید سلول‌های خونی و پلاکت‌های مغز استخوان در بدن به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. این سرکوب معمولاً ۲۱ تا ۲۸ روز پس از اولین درمان اتفاق می‌افتد، پس از آن سطح سلول‌های خونی و پلاکت‌ها در خون شروع به تثبیت می‌کنند و اغلب به سطوح پیش کربوپلاتین نزدیک می‌شوند. این کاهش گلبول‌های سفید (نوتروپنی) می‌تواند عوارضی ایجاد کند و گاهی اوقات با داروهایی مانند فیلگراستیم درمان می‌شود (۲۷). در مطالعه کشت سلولی حاضر درصد حیات سلول‌های نرمال ریوی پس از ۴۸ ساعت مواجهه با غلظت‌های متفاوت کربوپلاتین، از ۱۰۰ درصد در غلظت ۰/۳ میکرومولار به ۲۳/۷۸ درصد در غلظت ۳۰ میکرومولار کاهش پیدا کرده است. کربوپلاتین اثرات سمیت سلولی را به صورت وابسته به دوز نشان داده است. براساس آنالیزهای صورت گرفته سمیت بازدارندگی ۵۰ درصد رشد در سلول‌های ریوی مدل در کربوپلاتین برابر غلظت ۹/۲ میکرومولار گزارش شده است. هم‌چنین کربوپلاتین اختلافاً معنی‌داری در تست میکرونوکلئوس، اثرات ژنوتوکسیک پوتنتی نیز از خود نشان داده است. Yildiz-Ozer و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثرات هم‌افزایی ناشی از سرانیب-۲ و کربوپلاتین بر بقای سلولی و آپوپتوز در سلول‌های سرطان ریه را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس یافته‌ها تغییرات مورفولوژیکی و القای قطعه قطعه شدن DNA، اثرات آپوپتوتیک سرانیب-۲ و کربوپلاتین را در هر دو رده سلولی آشکار کرد. در نهایت، بیان Caspase3، Caspase9 و BAX افزایش یافت در حالی که بیان BCL-2 در هر دو سلول کاهش یافت. این دو



مطالعه، خواص ژنوتوکسیک کربوپلاتین در برابر سلول‌های طبیعی اثبات شد (۳۱). در مطالعه‌ای توسط Taghvaei و همکاران اثرات سایتوتوکسیک کربوپلاتین به همراه پلی‌فنل طبیعی اپی‌گالوکتچین گالات در سلول‌های سرطانی مری مورد بررسی قرار گرفت، میزان بیان ژن‌های کاسپازهای ۸ و ۹ در حالت درمان ترکیبی کربوپلاتین با EGCG به‌طور قابل توجهی نسبت به تک‌درمانی‌ها افزایش یافت (۳۲). در سال ۲۰۱۸، Shen و همکاران مکانیسم آپوپتوز در سلول‌های HN-3 (رده سلولی کارسینوم سلول سنگفرشی حنجره) القا شده توسط کربوپلاتین را، مورد بررسی قرار دادند. اثر پرو آپوپتوتیک CBCDA در سلول‌های HN-3 وابسته به زمان و دوز نشان داده شد. در مراحل بعدی، بیان کاسپاز-۸ به دلیل سیگنال‌های آپوپتوز ناشی از آسیب DNA، و همچنین تنظیم ژن دخیل در بیان کاسپاز-۹ و پلی ADP ریبوز پلیمرز افزایش یافت (۶). کربوپلاتین از طریق مکانیسم‌های مختلفی هم‌چون تداخل با تکثیر DNA، القای گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، تداخل در روند طبیعی تقسیم سلول‌ها و در نهایت ایجاد آپوپتوزیس باعث ایجاد سمیت سلولی در سلول‌ها می‌گردد (۳۳). سیلوستازول به‌عنوان داروی آنتی‌کوآگولانت، توانسته در مطالعه کشت سلولی، در پیش‌تریت با کربوپلاتین در غلظت  $IC_{50}$  معادل ۹/۲ میکرومولار، میانگین حیات سلول‌های نرمال ریوی از ۵۲/۳۷ درصد در تریت سیلوستازول در غلظت ۵ میکرومولار به همراه کربوپلاتین به ۸۲/۲۵ درصد در غلظت ۱۰۰ میکرومولار برساند. در مطالعه Li و همکاران در سال ۲۰۱۹، نشان داده شد که سیلوستازول زنده مانی را در سلول‌های قلبی در رت‌های مدل القا شده هیپوکسی افزایش داد. هم‌چنین آپوپتوز سلولی را مهار کرد و در نتیجه از بافت‌های میوکارد در برابر آسیب‌های ایسکمیک از طریق فعال کردن cAMP اثرات محافظتی خود را نشان داده است (۳۴).

در مطالعه حاضر در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار

سیلوستازول، بالاترین معنی‌داری در افزایش حیات سلول‌های نرمال نسبت به گروه کنترل مثبت را نشان داده است. ساختار سیلوستازول شامل یک بخش شیمیایی منحصر به فرد به نام کینولینون است که تصور می‌شود به اثرات محافظتی سلولی آن کمک می‌کند. سیلوستازول یک مهارکننده قوی فسفودی استراز نوع ۳ می‌باشد. سیلوستازول با مهار PDE3، سطح آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) را در سلول‌ها افزایش می‌دهد. سطوح بالای cAMP می‌تواند پروتئین کیناز A (PKA) و سایر مسیرهای سیگنال دهی پایین دست را فعال کند، که ممکن است به اثرات سیتوپروتکتیو سیلوستازول کمک کند. هم‌چنین سیلوستازول تجمع پلاکتی را مهار می‌کند و اثرات گشادکنندگی بر عروق خونی دارد. این اثرات می‌تواند جریان خون را بهبود بخشد و التهاب را کاهش دهد و به‌طور بالقوه به اثرات محافظت سلولی دارو کمک کند (۳۵). در سال ۲۰۲۲، بیان شد در مدل‌های رت، افزودن وراپامیل به سیلوستازول، فعالیت محافظتی کبدی را تقویت کرد و از پیشرفت سمیت کبدی ناشی از تیواستامید از طریق مسیر  $Nrf2/GSK-3\beta/NF-\kappa B$  و فعالیت آن‌ها بر استرس اکسیداتیو، التهاب و بیان پروتئین  $NF-\kappa B$  جلوگیری کرد. سیلوستازول خواص ضد التهابی از جمله مهار سیتوکین‌های پیش‌التهابی و تعدیل پاسخ‌های ایمنی را نشان داد که این اثرات ضد التهابی ممکن است به محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب و ارتقای سلامت سلولی کمک کند (۳۶).

در مطالعه حاضر نیز سیلوستازول در غلظت‌های متفاوت در پیش‌تریت با داروی کربوپلاتین، میانگین تولید میکرونوکلئوس‌های هسته را در سلول‌های لنفوسیت خونی به‌طور معنی‌داری کاهش داده است و اثرات ژنوتوکسیک قوی از خود نشان داده است. به‌طوری‌که میانگین تعداد ذرات هسته‌ای از ۲۸ عدد در غلظت ۵ میکرومولار سیلوستازول به ۸ عدد در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سیلوستازول به همراه کربوپلاتین رسیده است. در پژوهشی در سال ۲۰۲۰، اثرات سیلوستازول به

اشکال آسیب به محتوای ژنتیکی گردد (۳۹). هم‌چنین بیان شده که سیلوستازول دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند به محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو کمک کند. ROS، مانند رادیکال‌های آزاد، می‌تواند با ایجاد شکستگی رشته‌های DNA و تغییرات اکسیداتیو باعث آسیب DNA شوند. خواص آنتی‌اکسیدانی سیلوستازول ممکن است به کاهش آسیب DNA ناشی از ROS کمک کند (۴۰).

پژوهش حاضر اولین تحقیقی است که اثرات سایتوپروتکتیو و ژنوپروتکتیو سیلوستازول به عنوان ترکیبی آنتی‌کواگولانت و آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های مدل نرمال برونش انسانی و لنفوسیت‌های خون انسانی را مورد بررسی قرار می‌دهد. سیلوستازول اثرات محافظت سلولی و ژنتیکی خود را به ترتیب با افزایش رشد سلول‌های نرمال ریوی و کاهش تعداد ریزه‌سته‌ها (میکرونوکلئوس) در لنفوسیت‌های خونی در پیش‌درمانی ۲۴ ساعته نسبت به داروی کربوپلاتین به عنوان مدل القاکننده سمیت ژنتیکی و سلولی نشان داد. این یافته‌ها ممکن است پیامدهایی جهت توسعه استراتژی‌های درمانی جدید با هدف کاهش سمیت سلولی و ژنتیکی به‌عنوان عوارض جانبی مصرف داروی آنتی‌کنسر کربوپلاتین در نظر گرفته شود. اثرات محافظت سلولی و ژنتیکی سیلوستازول از دیدگاه مولکولی و مکانیسم‌های دقیق سیگنالینگ عملکردی را می‌توان در مطالعات آینده بررسی کرد.

عنوان یک مهارکننده فسفودی استراز III و یک داروی آنتی‌اکسیدانی قوی در برابر سمیت ژنتیکی ناشی از متوتروکسات بر لنفوسیت‌های خونی انسانی مورد بررسی قرار گرفت. متوتروکسات میزان ناهنجاری‌های کروموزومی و تبادل کروماتید خواهری را در سلول‌های لنفوسیت نسبت به گروه شاهد به‌طور معناداری افزایش داد. سیلوستازول در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به‌طور قابل توجهی شاخص میتوزی را کاهش داد که می‌تواند به اثر ضد تکثیر مرتبط باشد (۱۹). Lee و همکاران اثرات نوروپروتکتیو سیلوستازول در برابر آسیب ایسکمیک مغزی ناشی از قرار دادن موش‌ها در معرض انسداد ۲ ساعته شریان مغزی میانی (MCAO) و به دنبال آن خون‌رسانی مجدد ۲۴ ساعته را مورد مطالعه قرار دادند. افزایش قطعه شدن DNA در ناحیه نیم سایه به‌طور قابل توجهی توسط سیلوستازول کاهش یافت (۳۷).

در مطالعه‌ای حیوانی نشان داده شد که آسیب به DNA مشاهده شده در بافت‌های قشر مربوط به ناحیه نیم‌پامبرال توسط آسپیرین، کلپیدوگرل یا MCI-186 سرکوب نشد، اما به‌طور قابل توجهی توسط سیلوستازول سرکوب شد. سیلوستازول اثرات آنتی‌ژنوتوکسیک پوتنتی از خود نشان داد (۳۸). اثرات سیلوستازول بر گشاد کنندگی عروق می‌تواند جریان خون و اکسیژن‌رسانی به بافت‌ها را بهبود بخشد. تامین اکسیژن کافی برای جلوگیری از آسیب DNA ضروری است، زیرا هیپوکسی و ایسکمی می‌تواند منجر به شکستن رشته DNA و سایر

## References

1. Yu C, Zhou B, Xia X, Chen S, Deng Y, Wang Y, et al. Prevtotella copri is associated with carboplatin-induced gut toxicity. *Cell Death Dis* 2019; 10(10): 1-15.
2. Boyd LR, Muggia FM. Carboplatin/paclitaxel induction in ovarian cancer: the finer points. *Oncology (Williston Park)* 2018; 32(8): 418-420, 422-424.
3. Herath NI, Berthault N, Thierry S, Jdey W, Lienafa M-C, Bono F, et al. Preclinical studies comparing efficacy and toxicity of DNA repair inhibitors, Olaparib, and AsidNA, in the treatment of carboplatin-resistant Tumors. *Front Oncol* 2019; 9: 1097.
4. Kilic A, Barlak N, Sanli F, Aytatli A, Capik O, Karatas OF. Mode of action of carboplatin

- via activating p53/miR-145 axis in head and neck cancers. *Laryngoscope* 2020; 130(12): 2818-2824.
5. Fahmy SA, Ponte F, Sicilia E, El-Said Azzazy HM. Experimental and Computational Investigations of Carboplatin Supramolecular Complexes. *ACS Omega* 2020; 5(48): 31456-31466.
  6. Shen B, Mao W, Ahn JC, Chung PS, He P. Mechanism of HN-3 cell apoptosis induced by carboplatin: Combination of mitochondrial pathway associated with Ca<sup>2+</sup> and the nucleus pathways. *Mol Med Rep* 2018; 18(6): 4978-4986.
  7. Belal A, Alassaf A, Abdulrahman A-H, Dardas Z, Almousa H, Alsalem M, et al. Genotoxicity of cisplatin and carboplatin in cultured human lymphocytes: a comparative study. *Interdiscip Toxicol* 2019; 12(2): 93-97.
  8. Nunes SC, Ramos C, Lopes-Coelho F, Sequeira CO, Silva F, Gouveia-Fernandes S, et al. Cysteine allows ovarian cancer cells to adapt to hypoxia and to escape from carboplatin cytotoxicity. *Sci Rep* 2018; 8(1): 1-17.
  9. Luparello C, Cruciata I, Joerger AC, Ocasio CA, Jones R, Tareque RK, et al. Genotoxicity and Epigenotoxicity of Carbazole-Derived Molecules on MCF-7 Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2021; 22(7): 3410.
  10. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci* 2020; 21(4): 1534.
  11. Kherallah RY, Khawaja M, Olson M, Angiolillo D, Birnbaum Y. Cilostazol: a review of basic mechanisms and clinical uses. *Cardiovasc Drugs Ther* 2022; 36(4): 777-792.
  12. Motta NAV, Autran LJ, Brazao SC, de Oliveira Lopes R, Scaramello CBV, Lima GF, et al. Could cilostazol be beneficial in COVID-19 treatment? Thinking about phosphodiesterase-3 as a therapeutic target. *Int Immunopharmacol* 2021; 92: 107336.
  13. Chen PW, Tseng SY, Chang HY, Lee CH, Chao TH. Diverse Effects of Cilostazol on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 between Obesity and Non-Obesity. *Int J Mol Sci* 2022; 23(17): 9768.
  14. Oguchi T, Ono R, Tsuji M, Shozawa H, Somei M, Inagaki M, et al. Cilostazol suppresses A $\beta$ -induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through inhibition of oxidative stress and MAPK signaling pathway. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 337.
  15. Nazari I, Moosavi SM, Salimi N. Impact of Cilostazol on the Balloon Angioplasty for Infrapopliteal Artery Disease in Patients with Lower Limb Ischemia admitted to Vascular Surgery Ward of Ahwaz Golestan Hospital, Ahwaz City, Iran. *Jundishapur Scientific Medical Journal* 2022; 20: 620-627 (Persian).
  16. Christensen SL, Rasmussen RH, Ernstsen C, La Cour S, David A, Chaker J, et al. CGRP-dependent signalling pathways involved in mouse models of GTN-cilostazol-and levromakalim-induced migraine. *Cephalalgia* 2021; 41(14): 1413-1426.
  17. Chian CW, Lee YS, Lee YJ, Chen YH, Wang CP, Lee WC, et al. Cilostazol ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting high-glucose-induced apoptosis. *Korean J Physiol Pharmacol* 2020; 24(5): 403-412.
  18. Park SY, Bae JU, Hong KW, Kim CD. HO-1 Induced by Cilostazol Protects Against TNF- $\alpha$ -associated Cytotoxicity via a PPAR- $\gamma$ -dependent Pathway in Human Endothelial Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2011; 15(2): 83-88.

19. Rababa'h AM, Hussein SA, Khabour OF, Alzoubi KH. The Protective Effect of Cilostazol in Genotoxicity Induced by Methotrexate in Human Cultured Lymphocytes. *Curr Mol Pharmacol* 2020; 13(2): 137-143.
20. Saeed ZM, Khattab MI, Khorshid NE, Salem AE. Ellagic acid and cilostazol ameliorate amikacin-induced nephrotoxicity in rats by downregulating oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Plos One* 2022; 17(7): e0271591.
21. 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 (Persian).
22. Fujiwara Y, Banno H, Shinkai Y, Yamamoto C, Kaji T, Satoh M. Protective effect of pretreatment with cilostazol on cytotoxicity of cadmium and arsenite in cultured vascular endothelial cells. *J Toxicol Sci* 2011; 36(2): 155-161.
23. Aghajanshakeri S, Salmanmahiny A, Aghajanshakeri S, Babaei A, Alishahi F, Babayani E, et al. Modulatory effect of amifostine (WR-1065) against genotoxicity and oxidative stress induced by methotrexate in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Toxicol Mech Methods* 2023; 33(9): 755-765.
24. Shokrzadeh M, Dashti A, Aghajanshakeri S, Pourabbas B, Ghassemi Barghi N, Ogunkunle A. Prevention effects of *Foeniculum vulgare* (Fennel) hydroalcoholic extract for threatened abortion by misoprostol induction in experimental mice. *Int J Trad Nat Med* 2019; 9(1): 1-16.
25. Shokrzadeh M, Habibi E, Shadboorestan A, Chabra A, Ahmadi A. The protective effects of *Origanum vulgare* L. extract on genetic damage of cyclophosphamide in mice blood lymphocytes using micronucleus test. *Pharm Biomed Res* 2020, 6(4): 297-302 (Persian).
26. Wagstaff AJ, Ward A, Benfield P, Heel RC. Carboplatin: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer. *Drugs* 1989; 37(2): 162-190.
27. Aghajanshakeri S, Ataee R, Karami M, Aghajanshakeri S, Shokrzadeh M. Cytomodulatory characteristics of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) against cypermethrin on skin fibroblast cells (HFF-1). *Toxicology* 2023; 499: 153655.
28. Yildiz-Ozer M, Oztopcu-Vatan P, Kus G. The investigation of ceranib-2 on apoptosis and drug interaction with carboplatin in human non small cell lung cancer cells in vitro. *Cytotechnology* 2018; 70: 387-396.
29. de Souza AP, Lehmann M, Dihl RR. Comparative study on the induction of complex genomic alterations after exposure of mammalian cells to carboplatin and oxaliplatin. *Drug Chem Toxicol* 2017; 40(4): 410-415.
30. Azab B, Alassaf A, Abu-Humdan A, Dardas Z, Almousa H, Alsalem M, et al. Genotoxicity of cisplatin and carboplatin in cultured human lymphocytes: a comparative study. *Interdiscip Toxicol* 2019; 12(2): 93-97.
31. Jan BL, Ahmad A, Khan A, Rehman MU, Alkharfy KM. Protective effect of chrysin, a flavonoid, on the genotoxic activity of carboplatin in mice. *Drug Chem Toxicol* 2022; 45(5): 2146-2152.
32. Taghvaei F, Rastin SJ, Milani AT, Khameneh ZR, Hamini F, Rasouli MA, et al.

- Carboplatin and epigallocatechin-3-gallate synergistically induce cytotoxic effects in esophageal cancer cells. *Res Pharm Sci* 2021; 16(3): 240-249.
33. Pourmadadi M, Eshaghi MM, Shaghghi M, Das SS, Arshad R, Ghotekar S, et al. Nano-scale drug delivery systems for carboplatin: A comprehensive review. *OpenNano* 2023; 13: 100175.
34. Li J, Xiang X, Xu H, Shi Y. Cilostazol Promotes Angiogenesis and Increases Cell Proliferation After Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury Through a cAMP-Dependent Mechanism. *Cardiovasc Eng Technol* 2019; 10(4): 638-647.
35. Ono K, Tsuji M. Pharmacological Potential of Cilostazol for Alzheimer’s Disease. *Front Pharmacol* 2019; 10: 559.
36. Elsis AE, Elmarhoumy EH, Osman EY. Protective effect of cilostazol and verapamil against thioacetamide-induced hepatotoxicity in rats may involve Nrf2/GSK-3 $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Toxicol Res* 2022; 11(5): 718-729.
37. Lee JH, Kim KY, Lee YK, Park SY, Kim CD, Lee WS, et al. Cilostazol prevents focal cerebral ischemic injury by enhancing casein kinase 2 phosphorylation and suppression of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308(3): 896-903.
38. Lee JH, Park SY, Lee WS, Hong KW. Lack of antiapoptotic effects of antiplatelet drug, aspirin and clopidogrel, and antioxidant, MCI-186, against focal ischemic brain damage in rats. *Neurol Res* 2005; 27(5): 483-492.
39. Shichinohe H, Tan C, Abumiya T, Nakayama N, Kazumata K, Hokari M, et al. Neuroprotective effects of cilostazol are mediated by multiple mechanisms in a mouse model of permanent focal ischemia. *Brain Res* 2015; 1602: 53-61.
40. Chattipakorn SC, Thummasorn S, Sanit J, Chattipakorn N. Phosphodiesterase-3 inhibitor (cilostazol) attenuates oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the heart. *J Geriatr Cardiol* 2014; 11(2): 151-157.