

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

Mahboube Rahmati Kukandeh^{1,2}

Roya Fakhteh³

Mohammad Shokrzadeh^{4,5}

¹PhD 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 (IC₅₀). Subsequently, the effects of different concentrations of N-acetylcysteine (NAC), administered as a pretreatment before exposure to cyclophosphamide at its IC₅₀ 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)

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

محبوبه رحمتی کوکنده^{۲،۱}

رویا فاخته^۳

محمد شکرزاده^{۵،۴}

چکیده

سابقه و هدف: سیکلوفسفامید (CP) یک عامل آلکلیله کننده است که به طور گسترده برای درمان بدخیمی های خونی و انواع تومورهای اپیتلیال و همچنین برای درمان برخی از بیماری های غیر سرطانی استفاده می شود. N-استیل سیستئین (NAC) یک آنتی اکسیدان با فعالیت مهار رادیکال های آزاد است که مجموعه ای از گلو تاتیون احیاء شده درون سلولی (GSH) را بازیابی می کند، که اغلب در نتیجه افزایش وضعیت استرس اکسیداتیو و التهاب تخلیه می شود. 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 سلول های Hela تیمار شد تا میزان غلظت اپتیمم سمی (IC₅₀) به دست آمد. در ادامه اثرات N-استیل سیستئین در غلظت های 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 گلو تاتیون) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: سیکلوفسفامید با غلظت ۴/۵۶ میکروگرم/میلی لیتر، موجب کاهش معنی دار زنده مانی سلول های HeLa و افزایش سطح ROS و کاهش سطح GSH نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/001$). پیش تیمار با NAC در ترکیب با سیکلوفسفامید، زنده مانی سلولی را افزایش، تولید ROS را کاهش و سطح GSH را به طور وابسته به غلظت افزایش داد؛ این تغییرات در غلظت های ۳۱/۲۵ تا ۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر نسبت به سیکلوفسفامید معنی دار بود ($P < 0/001$).

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، گلو تاتیون

E-mail: Mslamuki@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد شکرزاده- ساری: موسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۱. دانشجوی دکتری 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

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 تأثیر 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 می‌شود که از این تعداد ۳۱۱۰۰۰ نفر جان خود را از دست می‌دهند و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰، بروز جهانی سرطان دهانه رحم تقریباً ۵۰ درصد افزایش یابد (۳-۵). کارسینوژن 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 سرطان‌های مهاجم دهانه رحم می‌شود. HPV حاوی دو آنکو پروتئین (E6 و E7) است که نقش اساسی در توسعه و پیشرفت سرطان دهانه رحم دارند. عفونت مداوم با انواع پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی با پاسخ‌های التهابی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) همراه است. در این زمینه، استرس اکسیداتیو، التهاب مزمن و ویروس پاپیلومای انسانی پرخطر می‌توانند به صورت هم افزایی عمل کنند (۷، ۸). در حال حاضر، درمان‌های اصلی سرطان دهانه رحم شامل جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی است که می‌توانند به تنهایی یا ترکیبی مورد استفاده قرار گیرند، البته این درمان‌ها 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).

سیکلو فسفامید یکی از قدیمی‌ترین داروهای ضد سرطان و شیمی درمانی و به عنوان یک عامل آلکیل 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 سیکلو فسفامید ناشی از فسفورامید موستارد است که از متابولیسم دارو توسط آنزیم‌های کبدی مانند سیتوکروم P-450 تشکیل می‌شود. آنزیم‌های کبدی ابتدا سیکلو فسفامید را به هیدروکسی سیکلو فسفامید تبدیل کرده و سپس به آلدو فسفامید متابولیزه می‌کنند. آلدو فسفامید به عامل آلکیل کننده فعال فسفورامید موستارد و آکروئین شکسته می‌شود. متابولیت فعال فسفورامید، یک کاتیون حلقوی آزیریدینیوم بسیار واکنش پذیر 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 واکنش پذیر در مولکول، می‌تواند پیوندهای متقاطع بین رشته‌ای و درون رشته‌ای DNA ایجاد کند. بنابراین اثرات سیکلو فسفامید وابسته به چرخه سلولی نیست. با این حال، همانند تمام عوامل آلکیل کننده، سلول‌های با تکثیر سریع بیش‌ترین حساسیت را به سیکلو فسفامید نشان می‌دهند (۱۴-۱۱). سیکلو فسفامید 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

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). آکروئین یک متابولیت سمی سیکلوفسفامید، مسئول تولید گونه‌های اکسیژن فعال بسیار واکنش‌پذیری (ROS) و افزایش لپید پراکسیداسیون می‌باشد، با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت تداخل دارد و برای سلول‌های پستانداران موثر است (۱۸، ۱۹). آکروئین به سرعت وارد سلول شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتریک اکسید داخل سلولی را تحریک می‌کند که منجر به تشکیل پرونوکی‌نیتريت شده و نهایتاً به پیامد آسیب به لپیدها، پروتئین‌ها و DNA داخل سلول می‌انجامد (۲۰). ان-استیل سیستین (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 التهابی آن در بافت‌های بدن تغییر می‌نمایند؛ بنابراین، استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند ان‌استیل سیستین، می‌تواند در این راستا اثر بخش باشد. از این حیث، در این مطالعه به بررسی اثر ان‌استیل سیستین در استرس اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید در رده سلولی Hela با روش ROS و گلو تاتیون پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

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 CO₂) رشد داده شدند و پس از رسیدن به تراکم ۸۰-۷۰ درصد با تریپسین - EDTA جداسازی و ساترفیوژ 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

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 MTT با 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 reader اندازه‌گیری شد. داده‌های به‌دست آمده برای محاسبه درصد زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل مورد تحلیل قرار گرفتند (۲۷).

اندازه‌گیری میزان ROS داخل سلولی

دی کلروفلوروسئین دی‌استات (DCFH-DA) به‌عنوان نشانگر برای تعیین سطح داخل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌های Hela مورد استفاده قرار گرفت. به‌طور خلاصه، سلول‌های 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).

اندازه‌گیری سطح گلووتاتیون

ابتدا سلول‌های Hela با تراکم (۱×۱۰^۶) سلول در هر چاهک در پلیت شش‌خانه‌ای برای اندازه‌گیری سطح گلووتاتیون (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 CO₂ انکوبه گردیدند. پس از تیمار سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، سلول‌ها در ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴

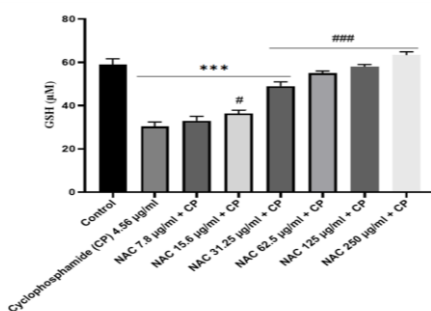
درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب سلولی را با یک میلی‌لیتر Buffer Lysing هموژن شد و پس از سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی جدا گردید و به‌عنوان نمونه استفاده شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر رقت استاندارد و نمونه به چاهک‌ها اضافه شد. سپس مقدار مساوی از محلول DTNB آماده شد و آنزیم گلووتاتیون رودکناز را مخلوط کرده و مقدار ۱۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل به چاهک‌ها اضافه گردید. در نهایت به مدت ۳۰ ثانیه پلیت انکوبه شد و سپس ۶۰ میکرولیتر محلول Cofactor به چاهک‌ها اضافه گردید و بلافاصله جذب نوری پلیت توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۱۲ نانومتر قرائت شد. کلیه محاسبات آماری برای مقایسه IC₅₀ 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 گرافیکی رسم شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصل از تست MTT 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 حالی که 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 می‌باشد (P < ۰/۰۵)، (P < ۰/۰۰۱).

سنجش گلو تاتیون

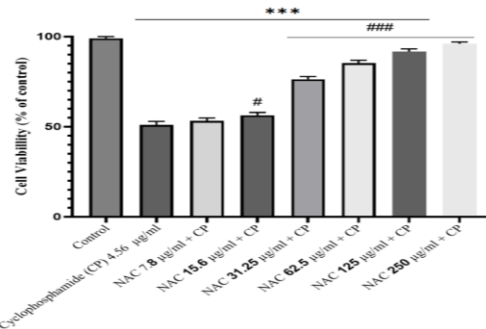
همان طور که در نمودار شماره ۳، نشان داده شده است، در گروه های تحت تیمار با NAC به همراه سیکلوفسفامید، با افزایش غلظت NAC، احیای گلو تاتیون مشاهده گردید. از لحاظ آماری، NAC در غلظت های ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر اختلاف معنی داری با گروه کنترل است ($P < 0.001$). نتایج نشان داد که در غلظت های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر NAC به همراه سیکلوفسفامید تفاوت معنی داری با گروه سیکلوفسفامید وجود دارد ($P < 0.05$). همچنین بین گروه کنترل و سیکلوفسفامید این معنی داری به صورت ($P < 0.001$) مشاهده شد.



نمودار شماره ۳: سنجش میزان تولید گلو تاتیون 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 داری دار با گروه کنترل ($P < 0.001$), ####: دارای اختلاف معنی داری دار با گروه سیکلوفسفامید ($P < 0.001$), #: دارای اختلاف معنی داری دار با گروه سیکلوفسفامید ($P < 0.05$)

بحث

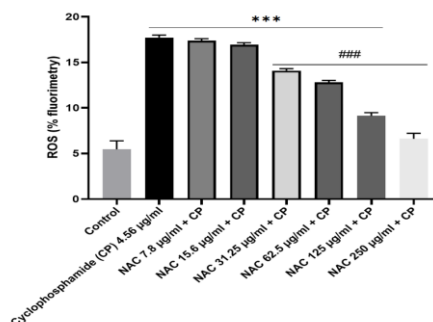
این مطالعه با هدف بررسی اثرات ان استیل سیستین ر استرس اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید در رده سلولی Hela طراحی شد. نتایج به دست آمده از آزمایش ها نشان دادند که سیکلوفسفامید به طور قابل توجهی باعث افزایش سمیت سلولی و کاهش حیات سلول ها شد. همچنین میزان گونه های فعال اکسیژن پس از تیمار با سیکلوفسفامید به طور چشمگیری افزایش یافت و سطح گلو تاتیون کاهش یافت. در این میان، تزریق پیش درمانی با



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 ($P < 0.001$). تیمار سلول ها با NAC در غلظت های مختلف از شدت تولید ROS کاست، به صورتی که در غلظت های ۷/۸ الی ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر با گروه کنترل اختلاف معنی دار داشت ($P < 0.001$). همچنین بین غلظت های ۳۱/۲۵ الی ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر NAC به همراه سیکلوفسفامید با گروه کنترل اختلاف به صورت معنی دار مشاهده شد ($P < 0.001$).



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 ($P < 0.001$)

NAC توانست 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 آکروئین، به‌طور قابل توجهی باعث کاهش زنده‌مانی سلولی شد.

سیکلوفسفامید یک داروی آلکیل 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 مئانه، 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. پاتورژن سمیت سیکلوفسفامید، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن از متابولی‌های سیکلوفسفامید است که نقش مهمی در بروز آسیب دارد. سمیت سیکلوفسفامید ناشی از اتصال آکروئین به نوکلئوفیل‌های آنتی‌اکسیدانی سلولی مانند گلوتاتیون است که منجر به تخلیه سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و همچنین شروع پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۳۰-۳۲).

آنتی اکسیدان‌هایی مانند NAC به عنوان ابزار 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 و P38 MAPK، 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، فیروز، 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/نیتريت 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 NAC با مهار استرس اکسیداتیو و نیتروژاتیو 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 به عنوان مدل آزمایشی برای ارزیابی اثرات درمان با-N استیل سیستئین 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 $TNF-\alpha$ را کاهش داد، همچنین بیان $TNF-\alpha$ ، $IFN-\gamma$ ، $NF-\kappa B$ و IL-8 را کاهش و بیان IL-10 را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افزایش داد. سطح سرمی آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز و آسپاراتات ترانس آمیناز کاهش یافت، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز افزایش و فعالیت مالون‌دی‌آلدئید

کاهش پیدا کرد. بنابراین، NAC موجب کاهش سرکوب ایمنی، آسیب کبدی و استرس اکسیداتیو در خوک‌های مینیاتوری تحت چالش سیکلوفسفامید می‌شود. این مطالعه نشان می‌دهد که N-استیل سیستئین کاربرد درمانی بالقوه‌ای در دام برای تعدیل واکنش‌های ایمنی، آسیب کبدی و استرس اکسیداتیو دارد (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۲، بیان شد که تجویز همزمان NAC و ویتامین E توانست به‌طور قابل توجهی عوارض جانبی سیکلوفسفامید، به‌ویژه در بافت تخمدان، را کاهش دهد (۳۶). در مطالعه حاضر نیز NAC در غلظت‌های متفاوت در پیش تیمار با داروی سیکلوفسفامید، میزان استرس اکسیداتیو را از طریق کاهش میزان ROS کاهش داد و همچنین سبب افزایش سطح گلو تاتیون شد.

در مطالعه بر روی رت‌های مبتلا به سمیت کبدی و کلیوی القا شده توسط سیس‌پلاتین مشاهده شد که سیس‌پلاتین با افزایش آنزیم‌های کبدی، اوره، کراتینین و لیپیدها و کاهش پروتئین، آلبومین و کلسترول، موجب استرس اکسیداتیو (افزایش MDA و کاهش GSH، SOD و کاتالاز)، آسیب بافتی و افزایش بیان کاسپاز-۳ در کبد و کلیه شد. تجویز لیکوپن و N-استیل سیستئین 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 سال ۲۰۲۱، به تحقیق بر روی بیماران مبتلا به سرطان پس از شیمی درمانی که ممکن است دچار اختلالات روان‌شناختی و شناختی شوند پرداختند. در این مطالعه، نشان داده شد که درمان ترکیبی دوکسوروبیسین و سیکلوفسفامید در رت‌ها موجب بروز رفتارهای شبه اضطرابی، اختلال شناختی و کاهش نسبت GSH/GSSG در هیپوکامپ می‌شود. تجویز NAC این تغییرات را معکوس کرده و اثر محافظتی در برابر اختلالات روان‌شناختی و استرس اکسیداتیو ناشی از شیمی درمانی نشان داد (۳۸). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۲، مشخص شد که NAC

ترکیبی است که توجه فزاینده‌ای در درمان اختلالات روان‌پزشکی به خود جلب کرده است. NAC عمدتاً از طریق فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و تعدیل گلو تامات مورد بررسی قرار گرفته و در درمان اختلالات نوروتکاملی، اختلالات طیف اسکیزوفرنی، اختلالات مرتبط با دوقطبی، اختلالات افسردگی، اضطراب، اختلالات وسواس-اجباری، اختلالات مصرف مواد، اختلالات نوروشناختی و درد مزمن مطالعه شده است. اگرچه شواهد پیش‌بالینی و توجیه نظری کافی برای استفاده از NAC در درمان بسیاری از اختلالات روان‌پزشکی وجود دارد، نتایج کارآزمایی‌های بالینی در بیش‌تر این اختلالات متناقض بوده است. با این حال، بسیاری از مطالعات قدرت آماری کافی نداشته و احتمالاً مدت زمان آن‌ها بسیار کوتاه بوده است، به‌طوری‌که برخی شواهد تنها پس از ماه‌ها درمان با NAC مشاهده شده‌اند. در حال حاضر، بیش‌ترین شواهد از اثرات سودمند NAC به‌عنوان درمان کمکی در علائم منفی اسکیزوفرنی، اوتیسم شدید، افسردگی و اختلالات وسواس-اجباری وجود دارد (۳۹). مطالعه حاضر نشان داد که سیکلوفسفامید با تحریک تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو، نقش مهمی در بروز سمیت سلولی دارد. این فرآیند به افزایش شاخص‌های اکسیداتیو در سلول‌ها منجر شد. تجویز NAC توانست به‌طور معنی‌دار سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو را کاهش دهد و اثر محافظتی آنتی‌اکسیدانی خود را نشان دهد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه خانم رویا فاخته از دانشگاه علوم پزشکی مازندران- واحد بین الملل رامسر می‌باشد. بنابراین نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری معاونت پژوهشی در حمایت از این طرح اعلام می‌دارند.

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. HP1 γ 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, Elrebeh 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- 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

- 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- Çeribaşı 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- 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, Kehrler JP. Cyclophosphamide toxicity: characterising

- 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 Schmiedeberg's 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