

اثر سمی وراپامیل بر سلول‌های منونوکلتر خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش

فاطمه حاجی قاسمی^۱

خلاصه

مقدمه: وراپامیل یک داروی مهارکننده کانال‌های کلسیمی است که به میزان گسترده‌ای در درمان بسیاری از بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله فشار خون و آریتمی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین برای وراپامیل اثرات ضد توموری / التهابی گزارش شده است. در این مطالعه اثر وراپامیل بر فعالیت تکثیر سلول‌های منونوکلتر نرمال خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش، در شرایط *In vitro* مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش: سلول‌های منونوکلتر نرمال خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c در محیط RPMI کامل کشت داده شده و سپس در فاز لگاریتمی رشد در مجاورت غلظت‌های مختلف وراپامیل (2×10^{-3} M - 2×10^{-6} M) در فاصله‌های زمانی مختلف قرار داده شدند. متعاقباً میزان تکثیر سلولی با دو روش رنگ آمیزی تریپان‌بلو و M.T.T مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: وراپامیل در غلظت‌های ≥ 1 mM موجب کاهش معنی‌داری در میزان تکثیر سلول‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل شد. به علاوه در غلظت ۱ mM از وراپامیل، کاهش فعالیت تکثیر سلول‌ها به‌طور معنی‌داری در ۷۲ ساعت بیش از ۴۸ ساعت و در ۴۸ ساعت بیش از ۲۴ ساعت بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه وراپامیل بر سلول‌های نرمال انسانی و موشی اثر سیتوتوکسیک وابسته به دوز نشان داد. با توجه به اینکه غلظت سمی وراپامیل برای سلول‌های نرمال در این مطالعه، بسیار بالاتر از غلظت سمی گزارش شده این دارو برای سلول‌های توموری بود، ممکن است حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به وراپامیل بالاتر از سلول‌های نرمال باشد و لذا وراپامیل می‌تواند در حذف سلول‌های سرطانی کاربرد بالقوه داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: وراپامیل، سمیت سلولی، سلول‌های منونوکلتر، ماکروفاژهای صفاقی

۱- دانشیار ایمنی‌شناسی گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران - آدرس پست الکترونیک: resooome@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۶/۲۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۱۲/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۲/۱۱

مقدمه

وراپامیل یک داروی مهارکننده کانال‌های کلسیمی است که به میزان گسترده‌ای در درمان بسیاری از بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله فشار خون و آریتمی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳-۱). همچنین افزایش اثرات ضد توموری چندین داروی شیمیایی توسط وراپامیل مشاهده شده است (۶-۴). در این رابطه افزایش اثرات داروهای شیمی درمانی در سرطان متاستاتیک کولون (۴) و همچنین افزایش اثر اپیتوتیک مهارکنندگان BCL-2 در لنفوم B-cell توسط وراپامیل گزارش شده است (۶). به علاوه، اثرات مفید وراپامیل در شیمی درمانی سرطان‌های هماتولوژیک مشاهده شده است (۷،۸). همچنین اثرات مهارتی تعدادی از بلوک‌کنندگان کانال‌های کلسیمی بر رشد و تهاجم سلول‌های توموری (۱۰،۹)، القای آپتوز در سلول‌های لوسمیک توسط یک بلوک‌کننده کانال‌های کلسیمی (۱۱) و سرکوب فراخوانی ماکروفاژهای صفاقی در موش توسط دو داروی مهارکننده کانال‌های کلسیمی (وراپامیل و آملودیپین) گزارش شده است (۱۲). در یک مطالعه در سال ۲۰۰۲، تجویز طولانی مدت وراپامیل موجب کاهش قابل توجه مونسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و NK-cells در موش گردیده است (۱۳).

در دو مطالعه اخیر اثرات سرکوب‌کنندگی وراپامیل به تأثیر مهارتی آن بر p-gp (p-glycoprotein) نسبت داده شده است (۱۲،۱۳). افزایش بیان p-gp بر سطح سلول‌های سرطانی موجب مقاومت این سلول‌ها نسبت به داروها می‌گردد (۱۳). اگرچه در درمان‌هایی که وراپامیل به همراه یک داروی ضد سرطانی مصرف شده است، اثرات ضد توموری / التهابی وراپامیل را به نقش آن در مهار p-gp نسبت داده‌اند (۱۴)، مطالعاتی هم وجود دارند که در آنها مصرف وراپامیل به تنهایی اثرات ضد توموری (۱۵) و ضد التهابی بر جای گذاشته است (۱۷،۱۶،۱۲). با توجه به اثرات ضد توموری و ضد التهابی وراپامیل و از طرفی نقش مهم

التهاب در پیشرفت سرطان (۱۸)، در این مطالعه اثر وراپامیل بر فعالیت تکثیر سلول‌های منونوکلئر نرمال خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش در شرایط *In vitro* به منظور تعیین دوز سمی داروی وراپامیل برای سلول‌های نرمال و مقایسه آن با دوز سمی این دارو برای سلول‌های سرطانی که در مطالعه قبلی نویسنده بدست آمده مورد مطالعه قرار گرفته است. انتخاب سلول‌های منونوکلئر نرمال خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش به دلیل نقش مهمی است که این سلول‌ها در التهاب دارند و التهاب پیش‌زمینه سرطان است (۱۸).

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات علوم پایه تجربی (Experimental) بوده و در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد تهران در سال ۱۳۹۰ انجام شده است.

محیط کشت RPMI، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، Dimethyl sulfoxide (DMSO)، فایکول‌هایپاک و تریپان‌بلو از شرکت Sigma (USA) تهیه شد. سرم جنین گوساله (FCS) از شرکت Gibco (USA) خریداری گردید. M.T.T از شرکت Merck (Germany) تهیه گردید. داروی خالص وراپامیل از شرکت داروسازی Sobhan Daru (تهران-ایران) خریداری شد. پلیت‌های کشت ۹۶ و ۲۴ خانه، فلاسک‌های کشت و لوله‌های درب‌دار استریل از شرکت NUNC (Falcon, USA) خریداری گردید. موش‌های نر BALB/c در سن حدود ۸ هفته توسط آزمایشگاه حیوانات دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران هدیه شد.

جدا سازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells: PBMCs) از ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر خون هیپارینه افراد داوطلب سالم با استفاده از فایکول‌هایپاک طبق روش Boyum جدا شدند (۱۹). با

۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از انقضای زمان انکوباسیون، میزان تکثیر سلول‌ها با روش‌های رنگ آمیزی تریپان بلو و M.T.T اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان تکثیر سلولی

به منظور سنجش تأثیر غلظت‌های مختلف دارو بر درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر سلولی، در پایان زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، از دو روش رنگ آمیزی با تریپان بلو (Trypan blue dye exclusion: TB) و M.T.T استفاده شد (۲۱، ۲۲).

الف) روش رنگ آمیزی تریپان بلو

اساس روش رنگ آمیزی تریپان بلو، عدم جذب رنگ توسط سلول‌های زنده و جذب آن توسط سلول‌های مرده است. درصد سلول‌های زنده با شمارش مستقیم سلول‌های زنده و مرده محاسبه می‌شود. درصد سلول‌های زنده برابر است با تعداد سلول‌های زنده به تعداد کل سلول‌ها (۲۱). این سنجش در در سه دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت.

ب) روش M.T.T

این آزمایش در سه دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. مبنای تست MTT، رنگ‌سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی 4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول می‌باشد (۲۲). پس از اتمام انکوباسیون در هر یک از سه دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، محیط کشت رویی هر چاهک دور ریخته شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 حاوی 10% FCS افزوده می‌شد. سپس ۲۰ μl محلول MTT (5 mg/ml) به هر چاهک اضافه و

قرارگیری خون روی محلول فایکول و سانتیفریژ، نفوسیت‌ها بر سطح محلول فایکول و در یک لایه شناور می‌شوند. این لایه نفوسیتی با پیپت پاستور استریل برداشته شده و پس از سه بار شستشو در RPMI 1640 برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

جدا سازی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c

ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c طبق روش Schon-Hegrad جدا شدند (۲۰). ابتدا در شرایط استریل، RPMI به صفاق موش تزریق شده و متعاقباً مایع صفاقی جمع‌آوری و در دور ۳۰۰ g شستشو داده شد. بعد محلول رویی دور ریخته شده و توده سلولی در RPMI حاوی ۱۰% FCS حل و شمارش شد. سپس تعداد 2×10^5 از این سلول‌ها به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شده و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در زمان انکوباسیون ماکروفاژها به کف پلیت می‌چسبند. پس از انقضای زمان انکوباسیون، سلول‌های غیر چسبنده با شستشو، از پلیت جدا شدند.

تهیه غلظت‌های مختلف از داروی وراپامیل

ابتدا دارو در آب مقطر حل شده و تا زمان استفاده در دمای 20°C - نگهداری شد. سپس در هنگام تیمار سلول‌ها، غلظت‌های 2×10^{-3} - 2×10^{-6} مولار از دارو در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید.

تیمار سلول‌ها

سلول‌ها در شرایط رشد اپتیمم به گروه‌های سه چاهکی تقسیم شده و به تعداد 2×10^5 cell/well در پلیت‌های کشت ۹۶ خانه در محیط کشت RPMI 1640 حاوی FCS 10% کشت داده شدند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شده و گروه‌های دیگر در مجاورت غلظت‌های مختلف از وراپامیل (2×10^{-3} - 2×10^{-6} M) به مدت ۲۴

چنانچه در شکل ۱ (A و B) مشاهده می‌شود، وراپامیل در غلظت‌های ≥ 1 mM موجب کاهش معنی‌داری در میزان تکثیر سلول‌های منونوکلئر خون محیطی انسان در هر سه فاصله زمانی مورد آزمایش در این مطالعه نسبت به گروه کنترل شد. همچنین کاهش فعالیت تکثیری سلول‌ها در غلظت ۲ mM از وراپامیل به طور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۱ mM دارو بود. به علاوه در غلظت ۱ mM از وراپامیل، کاهش فعالیت تکثیری سلول‌ها به طور معنی‌داری در ۷۲ ساعت بیش از ۴۸ ساعت و در ۴۸ ساعت بیش از ۲۴ ساعت بود.

۲- اثر داروی وراپامیل بر فعالیت تکثیری ماکروفاژهای صفاقی موش

ماکروفاژهای صفاقی موش در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از داروی وراپامیل قرار گرفتند. نتایج تأثیر وراپامیل بر فعالیت تکثیری ماکروفاژهای صفاقی موش در شکل ۲ (A و B) نمایش داده شده است. A و B به ترتیب نمایانگر نتایج روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و M.T.T هستند.

چنانچه در شکل ۲ (A و B) مشاهده می‌شود، وراپامیل در غلظت‌های ≥ 1 mM موجب کاهش معنی‌داری در میزان تکثیر ماکروفاژهای صفاقی موش در هر سه فاصله زمانی مورد آزمایش در این مطالعه نسبت به گروه کنترل شد. همچنین کاهش فعالیت تکثیری سلول‌ها در غلظت ۲ mM از وراپامیل به طور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۱ mM دارو بود. به علاوه در غلظت ۱ mM از وراپامیل، کاهش فعالیت تکثیری سلول‌ها به طور معنی‌داری در ۷۲ ساعت بیش از ۴۸ ساعت و در ۴۸ ساعت بیش از ۲۴ ساعت بود.

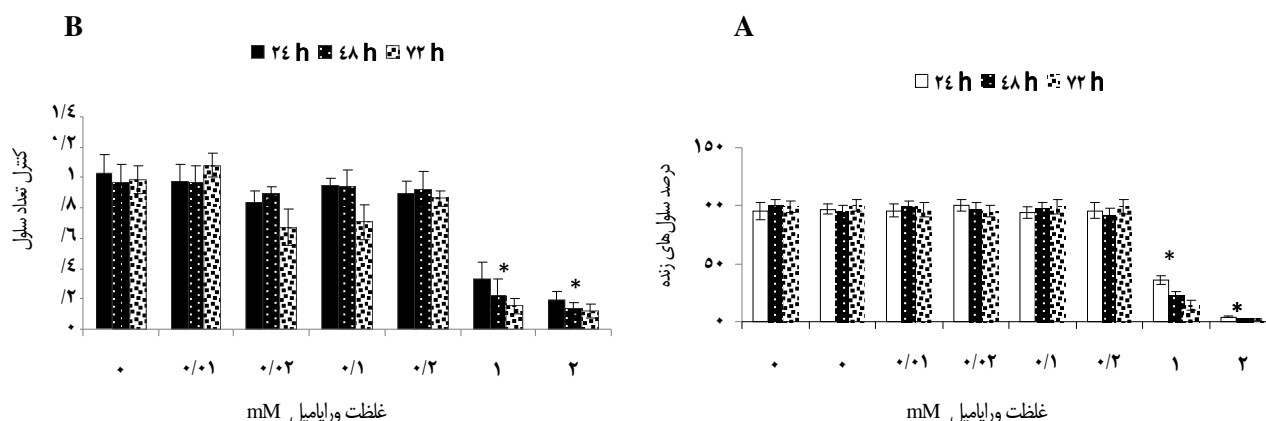
به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون کریستال‌های بنفش رنگی بر سطح سلول‌ها ایجاد می‌گردید. متعاقباً محیط حاوی MTT را از داخل چاهک‌ها خارج کرده و به هر چاهک ۱۰۰ μl ایزوپروپانول اسیدی افزوده می‌شد. ایزوپروپانول اسیدی موجب حل شدن کریستال‌های موجود در کف هر چاهک شده و سپس میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا-ریدر خوانده شده و میزان سلول‌های زنده در هر چاهک محاسبه می‌شد.

داده‌های به دست آمده در آزمایشات رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو TB و M.T.T، وارد نرم‌افزار آماری SPSS شده و میانگین و انحراف معیار نتایج به دست آمده در مورد سلول‌ها در غلظت‌های مختلف داروی وراپامیل، تعیین گردیده و سپس با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست (Tukey) post hoc مورد مقایسه قرار گرفتند. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارهای مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف دارو بر فعالیت تکثیری سلول‌ها در زمان‌های مختلف در نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

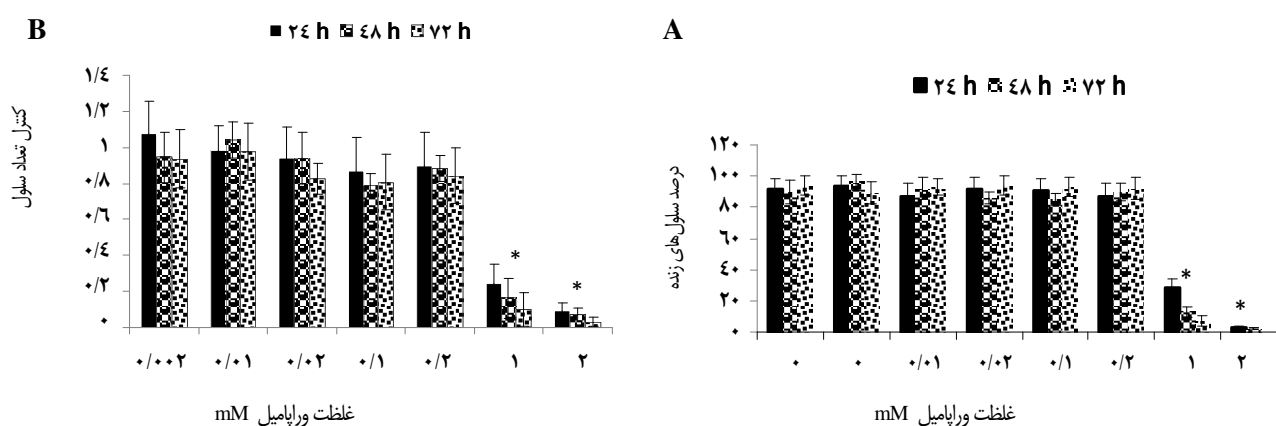
۱- اثر داروی وراپامیل بر فعالیت تکثیری سلول‌های منونوکلئر خون محیطی انسان

سلول‌های منونوکلئر خون محیطی انسان در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از داروی وراپامیل قرار گرفتند. نتایج تأثیر وراپامیل بر فعالیت تکثیری سلول‌های منونوکلئر خون محیطی انسان در شکل ۱ (A و B) نمایش داده شده است. A و B به ترتیب نمایانگر نتایج روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و M.T.T هستند.



شکل ۱. اثر داروی وریپامیل بر فعالیت تکثیری سلول‌های منونوکلیتر خون محیطی انسان

سلول‌های منونوکلیتر خون محیطی انسان در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از وریپامیل (۰/۰۰۲-۲ mM) قرار گرفتند. A و B به ترتیب نمایانگر نتایج روش‌های رنگ آمیزی تریان‌بلو و M.T.T. هستند. داده‌ها، میانگین \pm انحراف معیار به دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. * $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته می‌شود.



شکل ۲. اثر داروی وریپامیل بر فعالیت تکثیری ماکروفاژهای صفاقی موش

ماکروفاژهای صفاقی موش در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از وریپامیل (۰/۰۰۲-۲ Mm) قرار گرفتند. A و B به ترتیب نمایانگر نتایج روش‌های رنگ آمیزی تریان‌بلو و M.T.T. هستند. داده‌ها، میانگین \pm انحراف معیار به دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. * $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته می‌شود.

بحث

کاهش در غلظت ۲ mM از وریپامیل به طور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۱ mM دارو بود. به علاوه در غلظت ۱ mM از وریپامیل، کاهش فعالیت تکثیری سلول‌ها به طور معنی‌داری در ۷۲ ساعت بیش از ۴۸ ساعت و در ۴۸ ساعت بیش از ۲۴ ساعت بود.

در مورد اثرات سیتوتوکسیک وریپامیل در شرایط *In vitro* مطالعات نسبتاً محدودی وجود دارند (۸، ۲۳، ۲۴). دیگر مطالعات بعمل آمده در این مورد شامل بررسی اثر

در این مطالعه اثر داروی وریپامیل بر فعالیت تکثیری سلول‌های منونوکلیتر خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c در شرایط *In vitro* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، وریپامیل در غلظت‌های ≥ 1 mM موجب کاهش معنی‌داری در میزان تکثیر هر دو دسته سلول مورد مطالعه در هر سه فاصله زمانی مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل شد. این

وراپامیل در حضور سایر داروها (۲۵)، محرک حرارت (۵) و یا در شرایط *In vivo* و مدل‌های حیوانی می‌باشند (۲۶، ۲۷).

در مطالعه به‌عمل آمده توسط Meister و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر سلول‌های متعلق به رده‌های مولتیپل میلوما، وراپامیل در غلظت $70 \mu\text{M}$ ، هیچ اثر سمی بر سلول‌های ARH-77 و RPMI 8226 نشان نداد و تنها یک اثر سمیت سلولی ضعیفی بر سلول‌های JK-6L نشان داد (۸). در مطالعه حاضر هیچ اثر سمیت سلولی از وراپامیل در غلظت‌های کمتر از $1000 \mu\text{M}$ ، مشاهده نشد. اختلاف بین مطالعه حاضر و مطالعه Meister و همکاران می‌تواند تا حدودی ناشی از اختلاف در نوع سلول‌های مورد مطالعه یا روش‌های ارزیابی درصد سلول‌های زنده باشد. سلول‌های مورد بررسی در مطالعه Meister و همکاران، سرطانی و از منشأ مولتیپل میلوما بودند در حالیکه سلول‌های مورد مطالعه ما نرمال و دارای منشأ PBMC انسانی یا ماکروفاژهای صفاقی موشی بودند. به‌علاوه Meister و همکاران، از روش *alar blue* برای تعیین ویابیلیتی سلول‌ها و روش رنگ آمیزی *v*-فلورسنت ایزوتیوسیانات/ پروپیدیوم دیدید برای سنجش آپوپتوز سلولی استفاده کرده‌اند، در حالیکه ما در مطالعه خود روش‌های رنگ آمیزی تریپان بلو و M.T.T را برای بررسی تکثیر سلولی بکار بردیم. در مطالعه Meister و همکاران، سلول‌های مختلف حساسیت مختلف نسبت به وراپامیل نشان دادند. در مطالعه حاضر نیز حساسیت سلول‌های مورد مطالعه (سلول‌های منونوکلر خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش) نسبت به وراپامیل کمتر از حساسیت سلول‌ها در مطالعه Meister و همکاران نسبت به این دارو نشان داده شد. به نظر می‌رسد که حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به وراپامیل بالاتر از سلول‌های نرمال باشد.

در مطالعه به‌عمل آمده توسط شعبانی و همکاران در سال ۲۰۰۴، وراپامیل موجب کاهش تکثیر لکوسیت‌های خونی

در رت در شرایط *In vivo* شده است (۲۶) که تأییدی بر نتایج حاصل از مطالعه اخیر است. همچنین در بررسی بعمل آمده توسط Farias و همکاران در سال ۱۹۹۸، اثر سیتواستاتیک وسیع وراپامیل بر تکثیر سلول‌های سرطانی پستان در موش در شرایط *In vitro* و همچنین اثرات مهارى وراپامیل بر تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی پستان موش در شرایط *In vivo* گزارش شده است (۲۴) که مجدداً نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. در مطالعه به‌عمل آمده توسط Satoh و همکاران در سال ۲۰۱۱، مهار تکثیر لنفوسیت‌های طحال تحریک شده با Con-A در موش‌های کنترل و دیابتی پس از ۷۲ ساعت مجاورت با وراپامیل در شرایط *ex vivo* مشاهده شد (۲۳). در مطالعه دیگری که توسط Kameda و همکاران در سال ۲۰۰۱ در شرایط *In vitro* انجام شد، مشاهده شده است که وراپامیل در غلظت‌های ۱۰ و $100 \mu\text{M}$ آپوپتوز القا شده توسط حرارت در سلول‌های لوسمیک U937 را افزایش می‌دهد (۵). در مطالعه ما هیچگونه اثر سیتوتوکسیک از وراپامیل در غلظت‌های کمتر از $1000 \mu\text{M}$ مشاهده نشد. علت اختلاف نتایج پژوهش ما با مطالعه Kameda و همکاران ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط مطالعه، روش آزمایش و نوع سلول‌های مورد مطالعه باشد. Kameda و همکاران، اثر وراپامیل بر میزان آپیتوز القا شده توسط حرارت در سلول‌های سرطانی U937 را به روش فلوسیتومتری و الکتروفورز ژل آگارز (جهت سنجش تعداد قطعات DNA و اندازه‌گیری یون کلسیم) بررسی نمودند.

در مطالعه دیگری که توسط Grujic و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت، وراپامیل در غلظت $10 \mu\text{M}$ موجب کاهش تکثیر سلول‌های U937 تیمار شده با داروهای بستاتین و اکتینومایسین شده است که میزان تکثیر با روش رنگ آمیزی تریپان بلو ارزیابی شده است (۲۵). همانطور که ملاحظه می‌شود غلظت توکسیک وراپامیل در مطالعه گروجیک و همکاران ($10 \mu\text{M}$) بسیار کمتر از پایین‌ترین

نشانگر میزان تکثیر سلول‌های مولد آن‌ها باشد، مطالعه فوق می‌تواند به صورت غیرمستقیم تأییدی بر نتایج مطالعه حاضر یعنی کاهش تکثیر سلولی باشد. همچنین در مطالعه به عمل آمده توسط Das و همکاران در سال ۲۰۰۹، وراپامیل موجب کاهش بیان رسپتور پلاسمینوژن و سرکوب فراخوانی ماکروفاژهای درون صفاقی در پاسخ به ماده تیوگلیکولات گردیده است (۱۲). اثرات ضد التهابی وراپامیل که در مطالعات فوق گزارش شده است یک بار دیگر تأییدی بر نتایج پژوهش اخیر است زیرا سلول‌های منونوکلتر خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش نقش مهمی در التهاب دارند (۳۲، ۳۱، ۱۶). بنابراین اثرات ضد التهابی وراپامیل ممکن است تا حدی ناشی از اثر مهاری آن بر فعالیت تکثیری منوسیت‌ها و ماکروفاژها باشد. با توجه به اینکه غلظت سمی داروی وراپامیل برای سلول‌های نرمال منونوکلتر خون محیطی انسان و ماکروفاژهای صفاقی موش که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند ($\geq 1000 \mu\text{M}$)، بسیار بالاتر از غلظت سمی گزارش شده این دارو برای رده‌های سلولی سرطانی است (۱۵، ۵۸)، به نظر می‌رسد که حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به وراپامیل بالاتر از سلول‌های نرمال باشد و لذا وراپامیل می‌تواند برای از بین بردن سلول‌های سرطانی کاربرد بالقوه داشته باشد.

از آنجایی که در سال‌های اخیر برای برخی از داروهای متداول مورد استفاده در بیماری‌های قلبی اثرات دیگری علاوه بر تأثیرات شناخته شده قبلی گزارش شده (۳۴، ۳۳) و از طرفی مطالعه حاضر در شرایط *in vitro* انجام شده است، بررسی دقیق‌تر اثرات سمی داروی وراپامیل بر سلول‌های نرمال حائز اهمیت بوده و نیاز به مطالعات بیشتری در این خصوص در شرایط *in vivo* و *in vitro* دارد.

دوز توکسیک در مطالعه ما ($1000 \mu\text{M}$) می‌باشد. تفاوت نتایج پژوهش حاضر با مطالعه Grujic و همکاران می‌تواند تا حدی ناشی از اختلاف در شرایط و نوع سلول‌های مورد مطالعه باشد چرا که ما داروی وراپامیل را به تنهایی به کار بردیم در حالیکه Grujic و همکاران مخلوطی از داروهای وراپامیل، بستاتین و اکتینومایسین را همزمان استفاده کرده‌اند. به علاوه در مطالعه Grujic و همکاران سلول‌های لوسمیایی U937 که دارای منشأ سرطانی هستند مورد بررسی قرار گرفتند (۲۵) در حالیکه سلول‌های مورد مطالعه ما نرمال بودند.

افزایش اثرات ضد توموری چندین داروی شیمی درمانی توسط وراپامیل در انواعی از سرطان‌ها مثل سرطان متاستاتیک کولون، لنفوم B cell و سرطان سلول‌های کبدی گزارش شده است (۲۸، ۴۶). افزایش اثرات داروهای شیمی درمانی در سرطان توسط وراپامیل، به نقش وراپامیل در مهار ظرفیت مقاومت دارویی (MDR: multidrug resistance) سلول‌های سرطانی نسبت داده شده است (۳۰، ۲۹). نتایج مطالعه ما به همراه سایر مطالعات (۲۴، ۲۳) نشان می‌دهد که وراپامیل به تنهایی می‌تواند یک اثر سیتوتوکسیک وابسته به غلظت داشته باشد و حساسیت سلول‌های مختلف نسبت به وراپامیل متفاوت است. در این راستا، اثرات ضد توموری وراپامیل که توسط محققین مختلف گزارش شده است (۲۸، ۶-۴) ممکن است تا حدی ناشی از اثرات سیتوتوکسیک مستقیم این دارو باشد.

گزارشات متعددی نیز در مورد نقش ضد التهابی وراپامیل وجود دارد. از جمله در مطالعه‌ای که توسط Matsumori و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفته، کاهش تولید سایتوکاین‌های $\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{IFN-}\gamma$ و $\text{IL-1}\beta$ در سلول‌های منونوکلتر خون محیطی توسط وراپامیل مشاهده شده است (۱۶). از آنجا که میزان تولید این سایتوکاین‌ها می‌تواند

References

- Hegazi MO, Aldabie G, Al-Mutairi S, El Sayed A. Junctional bradycardia with verapamil in renal failure – care required even with mild hyperkalaemia. *J Clin Pharm Ther* 2012; 37(6):726-8.
- Ulimoen SR, Enger S, Carlson J, Platonov PG, Pripp AH, Abdelnoor M, et al. Comparison of four single-drug regimens on ventricular rate and arrhythmia-related symptoms in patients with permanent atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2013; 111(2): 225-30.
- Salabei JK, Balakumaran A, Frey JC, Boor PJ, Treinen-Moslen M, Conklin DJ. Verapamil stereoisomers induce antiproliferative effects in vascular smooth muscle cells via autophagy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 262(3): 265-72.
- Liu Y, Lu Z, Fan P, Duan Q, Li Y, Tong S, et al. Clinical efficacy of chemotherapy combined with verapamil in metastatic colorectal patients. *Cell Biochem Biophys* 2011; 61(2): 393-8.
- Kameda K, Kondo T, Tanabe K, Zhao QL, Seto H. The role of intracellular ca^{2+} in apoptosis induced by hyperthermia and its enhancement by verapamil in U937 cells. *Int J Radiat oncol biol Phys* 2001; 49(5): 1369-79.
- Vogler M, Dickens D, Dyer MJ, Owen A, Pirmohamed M, Cohen GM. The B-cell lymphoma 2 (BCL2)-inhibitors, ABT-737 and ABT-263, are substrates for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 408(2): 344-49.
- Wang JC, Liu XY, Lu WL, Chang A, Zhang Q, Goh BC, Lee HS. Pharmacokinetics of intravenously administered stealth liposomal doxorubicin modulated with verapamil in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 62(1): 44-51.
- Meister S, Frey B, Lang VR, Gaipf US, Schett G, Schlötzer-Schrehardt U, et al. Calcium channel blocker verapamil enhances endoplasmic reticulum stress and cell death induced by proteasome inhibition in myeloma cells. *Neoplasia* 2010; 12(7): 550-61.
- Conrad DM, Furlong SJ, Doucette CD, West KA, Hoskin DW. The Ca^{2+} channel blocker flunarizine induces caspase-10-dependent apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Apoptosis* 2010; 15(5): 597-607.
- Li W, Zhang SL, Wang N, Zhang BB, Li M. Blockade of T-type Ca^{2+} channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Invest* 2011; 29(5): 339-46.
- Yanamandra N, Buzzeo RW, Gabriel M, Hazlehurst LA, Mari Y, Beaupre DM, Cuevas J. Tipifarnib-induced apoptosis in acute myeloid leukemia and multiple myeloma cells depends on Ca^{2+} influx through plasma membrane Ca^{2+} channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337(3): 636-43.
- Das R, Burke T, Van Wagoner DR, Plow EF. L-Type calcium channel blockers exert an anti-inflammatory effect by suppressing expression of plasminogen receptors on macrophages. *Circ Res* 2009; 105(2): 167-75.
- Bonhomme-Faivre L, Forestier F, Auchère D, Soursac M, Orbach-Arbouys S, Farinotti R. Chronic administration of verapamil, ketoconazole and carbamazepine: impact on immunological parameters. *Int J Pharm* 2002; 238(1-2): 133-7.
- Eichhorn T, Efferth T. P-glycoprotein and its inhibition in tumors by phytochemicals

- derived from Chinese herbs. *J Ethnopharmacol* 2012; 141(2): 557-70.
15. Hajjighasemi F, Kakadezfuli N. Sensitivity of monocytic cells to verapamil *in vitro*. *Research Journal of Biological Sciences*. 2012; 7(5): 209-14.
 16. Matsumori A, Nishio R, Nose Y. Calcium channel blockers differentially modulate cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Circ J* 2010; 74(3): 567-71.
 17. Shima E, Katsube M, Kato T, Kitagawa M, Hato F, Hino M, et al. Calcium channel blockers suppress cytokine-induced activation of human neutrophils. *Am J hypertens* 2008; 21(1): 78-84.
 18. Matkar SS, Durham A, Brice A, Wang TC, Rustgi AK, Hua X. Systemic activation of K-ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice. *Am J Cancer Res* 2011; 1(4): 432-45.
 19. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97: 7.
 20. Schon-Hegrad M.A., Holt P.G. Improved method for the isolation of purified mouse peritoneal macrophages. *J Immunol Methods* 1981; 43(2): 169-73.
 21. Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* 1978; 52: 60-71.
 22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
 23. Satoh E, Iwasaki R. Experimental diabetes attenuates calcium mobilization and proliferative response in splenic lymphocytes from mice. *J Physiol Sci* 2011; 61(1): 23-30.
 24. Farias EF, Aguirre Ghiso JA, Ladedá V, Baldeker E. Verapamil inhibits tumor protease production, local invasion and metastasis development in murine carcinoma cells. *Int J Cancer* 1999; 78(6): 727-34.
 25. Grujic M, Renko M. Aminopeptidase inhibitors bestatin and actinonin inhibit cell proliferation of myeloma cells predominantly by intracellular interactions. *Cancer letters* 2002; 182(2): 113-9.
 26. Shabani M, Zahediasl S, Manaheji H. Study of chronic oral administration of verapamil on immunologic and hematologic parameters of male rats. *Yakhteh* 2004; 6(2): 65-8.
 27. Degasperis G.R, Zecchin K.G, Borecky J, Cruz-Hofling M.A, Castilho R.F, Velloso L.A, et al. Verapamil-sensitive Ca²⁺ channel regulation of Th1-type proliferation of splenic lymphocytes induced by Walker 256 tumor development in rats. *Europ J Pharmacol* 2006; 549(1-3): 179-84.
 28. Song XR, Zheng Y, He G, Yang L, Luo YF, He ZY, et al. Development of PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine and verapamil for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Pharm Sci* 2010; 99(12): 4874-9.
 29. Liu R, Zhang Y, Chen Y, Qi J, Ren S, Xushi MY, et al. A novel calmodulin antagonist O-(4-ethoxyl-butyl)-berbamine overcomes multidrug resistance in drug-resistant MCF-7/ADR breast carcinoma cells. *J Pharm Sci* 2010; 99(7): 3266-75.
 30. Kim YK, Kim NH, Hwang JW, Song YJ, Park YS, Seo DW, et al. Histone deacetylase inhibitor apicidin-mediated drug resistance: involvement of P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368(4): 959-64.

31. Popi AF, Osugui L, Perez KR, Longo-Maugéri IM, Mariano M. Could a B-1 cell derived phagocyte "be one" of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? *PLoS One* 2012; 7(3): e34570.
32. Saeki K, Kanai T, Nakano M, Nakamura Y, Miyata N, Sujino T, et al. CCL2-induced migration and SOCS3-mediated activation of macrophages are involved in cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 2012; 142(4): 1010-20.
33. Hajighasemi F, Hajighasemi S. Effect of propranolol on angiogenic factors in human hematopoietic cell lines *in vitro*. *Iran Biomed J* 2009; 13 (4): 223-8.
34. Hajighasemi F, Mirshafiey A. Propranolol effect on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion in human immunocompetent cells. *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research* 2010; 2(2): 22-27.

Toxic Effect of Verapamil on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and BALB/c Peritoneal Macrophages, *in vitro*

Hajighasemi F., Ph.D.¹

1. Associate Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

e-mail: resoome@yahoo.com

(Received: 20 Sep. 2012 Accepted: 1 May 2013)

Abstract

Background & Aims: Verapamil as a calcium channel blocker has been broadly used in the treatment of many cardiovascular diseases such as hypertension and arrhythmia. Furthermore, the anti-tumor/ anti-inflammatory effects of verapamil have been shown. In the present study, the cytotoxic effect of verapamil on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and BALB/c peritoneal macrophages has been evaluated *in vitro*.

Methods: Human PBMCs and BALB/c peritoneal macrophages were cultured in complete RPMI medium. Then the cells at logarithmic growth phase were incubated with different concentrations of verapamil (2×10^{-6} - 2×10^{-3} M) for 24, 48 and 72 hours. Subsequently the cell proliferation was assessed with Trypan blue dye exclusion and MTT 3-[4, 5-dimethyl thiazol-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide] methods.

Results: Verapamil significantly decreased the proliferation of the human PBMCs and BALB/c peritoneal macrophages dose-dependently. This cytotoxic effect was shown at ≥ 1 mM concentration of the verapamil after 24h incubation time onwards. Moreover, the cytotoxic effect of verapamil at 1mM concentration of the drug increased with time in this order: 24h> 48h>72h.

Conclusions: In this study, verapamil showed a dose -dependent cytotoxic effect on the human PBMCs and BALB/c peritoneal macrophages. Since the cytotoxic dose of verapamil on normal cells showed in this study was much higher than that reported for tumor cells, it seems that tumor cells may be more sensitive to verapamil than normal cells. Thus, verapamil could have potential implication in the treatment of cancers.

Keywords: Cytotoxicity, verapamil, mononuclear cells, peritoneal macrophages

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(6): 555-565