

تحقیقی

اثر دیکلوفناک بر تکثیر و تمایز سلول‌های PC12 در محیط کشت

چکیده

زمینه و هدف: دیکلوفناک از گروه داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی است که برای کاهش درد و التهاب تجویز می‌شود. اطلاعات اندکی در مورد اثر دیکلوفناک بر سلول‌های عصبی موجود است. این مطالعه به منظور بررسی اثرات دیکلوفناک سدیم بر تکثیر و تمایز سلول‌های PC12 در محیط کشت انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۳ در مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام شد. تکثیر سلول در دو محیط کشت بدون سرم Neurobasal تکمیل شده با مکمل B27 و محیط کشت DMEM/F12 دارای ۱۰ درصد FBS با روش XTT-assay سنجش شد. تمایز سلولی القاء شده به وسیله عامل رشد عصب (NGF) با اندازه‌گیری طول نوریت‌های سلول بررسی شد.

یافته‌ها: سمیت دارو در محیط کشت Neurobasal تکمیل شده با مکمل B27 در رقت‌های بالاتر از ۳۱۰ میکرومول مشاهده شد. سمیت در محیط کشت DMEM/F12 افزایش یافت، به ترتیبی که در رقت‌های ۱۵۵ و ۳۱۰ میکرومول رشد سلول ۴۰ و ۸۵ درصد کاهش یافت ($P < 0/05$). ژنریک‌های مختلف دارو سمیت برابری بر سلول‌های PC12 اعمال کردند. تمایز سلول PC12 القاء شده با NGF در رقت‌های توکسیک دارو نیز کاهش یا افزایش نیافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه دلیل سمیت دیکلوفناک بر سلول‌های عصبی را از طریق تداخل در رشد سلولی و نه تمایز سلولی معرفی می‌کند. تفاوت سمیت سلولی دیکلوفناک در دو محیط کشت، با توجه به این که مکمل B27 دارای چندین ترکیب آنتی‌اکسیدان است، استرس اکسیداتیو را به عنوان یکی از مکانیسم‌های سمیت دارو پیشنهاد می‌کند.

کلید واژه‌ها: سمیت سلولی، دیکلوفناک، تمایز سلول عصبی، PC12، عامل رشد عصب

سعید رجبعلیان

فوق لیسانس بیولوژی سلولی و مولکولی
پژوهشگر مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان
دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دکتر منظومه شمسی میمندی

دکترای داروسازی و عضو هیأت علمی گروه فیزیولوژی
دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دکتر شهریار دبیری

استادیار گروه آسیب‌شناسی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی کرمان

رفعت حسینی

کارشناس میکروبیولوژی
مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان
دانشگاه علوم پزشکی کرمان

نویسنده مسئول: سعید رجبعلیان

پست الکترونیکی: srajabalian@yahoo.com

نشانی: کرمان، بلوار جمهوری، معاونت پژوهشی دانشگاه علوم

پزشکی کرمان، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان

تلفن: ۰۳۴۱-۲۱۲۰۵۴۶

تمایز: ۲۱۱۱۰۱۰

وصول مقاله: ۸۵/۸/۱

اصلاح نهایی: ۸۶/۸/۱۹

پذیرش مقاله: ۸۶/۸/۲۲

مقدمه

داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) به صورت گسترده‌ای برای کاهش درد، تب و التهاب در بیماران آرتریت، استئوآرتریت، روماتوئید آرتریت و درد عضلانی حاد تجویز می‌شوند. دیکلوفناک یکی از NSAIDs، ترکیب لیپوفیل با دو حلقه آروماتیک است و به صورت عمدتاً به آلبومین پلاسما متصل می‌شود. اثرات درمانی دارو از طریق مهار فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز و توقف سنتز پروستاگلندین‌ها اعمال می‌شود. دارو در کبد به وسیله سیتوکروم P450 به متابولیت‌های ۴- هیدروکسی دیکلوفناک و ۵- هیدروکسی دیکلوفناک متابولیزه می‌شود (۴-۱). موارد متعددی از اثرات سوء دارو بر بافت عضله، کبد، دستگاه گوارش و سیستم عصبی مرکزی افراد مصرف کننده گزارش شده است (۷-۵). همچنین افزایش خطر سکته قلبی در افرادی که داروی دیکلوفناک را به مدت طولانی مصرف می‌کنند، گزارش شده است (۸). Sen و همکاران اثرات سوء دیکلوفناک را بر ترمیم بافت استخوان گزارش کردند (۹). اثرات سوء دیکلوفناک بیشتر در زنها و افراد مسن دیده شده است (۱۰ و ۱۱). دارو با افزایش نفوذپذیری غیرانتخابی غشاء داخلی میتوکندری و به دنبال آن افزایش فعالیت آنزیم‌های کاسپاز خودکشی سلولی را در کشت هیپاتوسیت‌ها باعث شده است (۱۲ و ۱۳). همچنین، استرس اکسیداتیو در نتیجه متابولیسم اکسیداتیو دارو و قطعه قطعه شدن DNA در بافت کلیه موش صحرایی گزارش شده است (۱۴). Yamazaki و همکارانش اثر شماری از NSADs را بر رشد و آپوپتوز سلول‌های سینوویال بررسی کردند. دیکلوفناک در مطالعه این گروه بیشترین سمیت را در بین NSADs داشت (۱۵).

شکل تزریق داخل عضلانی دیکلوفناک در داخل کشور مصرف گسترده‌ای داشته و تنها بیش از ۸۵ میلیون آمپول دیکلوفناک در سال ۱۹۹۸ میلادی مصرف شده است. همچنین ۱۷۶ مورد عوارض جانبی ناشی از تزریق داخل عضلانی دارو شامل فلج پا و نکروز بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۲ میلادی به مرکز مراقبت‌های دارویی کشور گزارش شده است (۱۶). علی‌رغم مطالعه اثرات سوء دیکلوفناک بر کبد، کلیه و دستگاه گوارش، دانش کنونی ما در مورد اثر این دارو بر

بافت‌های عصبی اندک است. بنابراین مطالعه میزان سمیت دارو بر سلول‌های عصبی اهمیت می‌یابد.

رده سلولی PC12 جدا شده از فئوکروموسایتوما موش صحرایی در محیط کشت ویژگی‌های سلول عصبی را بروز می‌دهد. تمایز سلول‌های PC12 در پاسخ به NGF با گسترش نوریت‌های سلولی نمایان می‌شود (۱۷). در تحقیق حاضر سمیت سلولی داروهای دیکلوفناک تولید شرکت‌های داروسازی ابوریحان، داروپخش، Voltaren و کمپانی Sigma بر رده سلولی PC12 سنجش و مقایسه شد. همچنین اثر دیکلوفناک داروپخش و Sigma بر روند تمایز سلول‌های PC12 ناشی از NGF با توجه به میانگین بلندترین طول نوریت‌های سلولی بررسی و مقایسه شد.

روش بررسی

داروها و مواد: این مطالعه تجربی طی سال ۱۳۸۳ در مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام شد. فورمولاسیون‌های داخل عضلانی دیکلوفناک ساخت شرکت‌های داروسازی Voltaren، ابوریحان و داروپخش از داروخانه خریداری شد. دارو در ویال‌های ۷۵ میلی‌گرمی با دوز ۲-۱ میلی‌گرم به ازاء هر گیلوگرم وزن بدن تجویز می‌شود. گرید خالص شیمیایی دارو از کمپانی Sigma خریداری شد و در اتانول مطلق حل گردید. عامل رشد عصب (NGF)، تریپسین، محیط کشت DMEM-F12 از کمپانی Sigma-Aldrich خریداری شدند. محیط کشت Neurobasal، B27 Supplement، سرم جنین گاو (FBS) از کمپانی Gibco-BRL-UK خریداری شد. کیت سنجش تکثیر سلول XTT از کمپانی Roch آلمان، فلاسک‌ها، پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای کشت سلول و لوله‌های سانتریفوژ از کمپانی‌های Falcon و NUNC خریداری شدند. رده سلولی PC12 از بانک سلولی ایران خریداری شد.

کشت سلول: سلول‌های PC12 در محیط کشت DMEM-F12 بدون فنول رد تکمیل شده با ۱۰ درصد (FBS)، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتوماایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (محیط کشت کامل) در اتمسفر مرطوب ۵ درصد CO₂، ۹۵ درصد هوا و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محیط کشت هر ۳ روز یک‌بار تعویض گردید و واکشت سلول‌ها هر هفته یک مرتبه انجام شد.

کشت کامل DMEM-F12 تهیه شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون در پلیت های ۳۵ میلی متری به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون و تخلیه محیط کشت، سلول ها در ۱/۵ میلی لیتر محیط کشت کامل حاوی ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دیکلوفناک (Sigma و داروپخش) و ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر NGF به مدت ۷۲ ساعت دیگر انکوبه شدند. کشت سلول در محیط کامل حاوی ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر NGF نیز منظور شد. محیط کشت پلیت ها پس از پایان انکوباسیون با محیط کشت کامل حاوی ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر NGF تعویض شد و انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت دیگر ادامه یافت. پاسخ به NGF در پایان با اندازه گیری بلندترین طول نوریت های ۲۰۰ سلول در دو پلیت همسان در میدان های دید مختلف میکروسکوپ اینورت به صورت تصادفی با بزرگ نمایی ۲۵۰ برابر به وسیله قطعه چشمی مدرج بررسی شد.

پردازش آماری داده ها با آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و مقایسه چندگانه با آزمون Tukey HSD انجام شد.

یافته ها

سمیت سلولی داروهای ساخت شرکت های داروسازی ابوریحان، داروپخش، Voltaren و گرید شیمیایی کمپانی Sigma بر رشد و تکثیر سلول های PC12 سنجنش و مقایسه شد. به دنبال مجاورت با رقت های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر داروها در محیط کشت Neurobasal تکمیل شده، تغییری در رشد و تکثیر سلولی در مقایسه با کشت کنترل مشاهده نشد (نمودار ۱).

به دنبال مجاورت با ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دیکلوفناک ساخت Sigma و Voltaren کاهش رشد بیش از ۹۸ درصد و داروهای ابوریحان و داروپخش به ترتیب کاهش رشد معادل ۸۸ درصد و ۸۴ درصد مشاهده شد ($P < 0/05$). آنالیز آماری تفاوتی بین سمیت ژنریک های مختلف دیکلوفناک نشان نداد. سمیت دیکلوفناک (Sigma) در محیط کشت DMEM/F12 افزایش یافت. به ترتیبی که در رقت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر رشد سلول ۴۰ درصد و ۸۵ درصد کاهش یافت ($P < 0/05$).

سنجنش سمیت سلولی داروها: سمیت سلولی داروها در محیط کشت بدون سرم Neurobasal تکمیل شده با مکمل B27 و محیط کشت کامل DMEM-F12 با روش XTT assay سنجنش شد. بدین ترتیب که ابتدا سوسپانسیون های سلولی معادل صدهزار سلولی در میلی لیتر در محیط های کشت تهیه شد. ده هزار سلول در حجم یکصد میکرولیتر از هر سوسپانسیون به هر چاهک پلیت ۹۶ حفره ای ریخته شد. سپس رقت های مختلف داروها در محیط های کشت تهیه شد. ۵۰ میکرولیتر از هر رقت دارو به شش چاهک افزوده شد. به ترتیبی که رقت نهایی دارو در ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تنظیم گردید. شش چاهک شامل سلول و محیط کشت به عنوان کنترل رشد سلول در نظر گرفته شد. پلیت ها در شرایط استاندارد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. رشد و تکثیر سلول در پایان زمان انکوباسیون، طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت سنجنش تکثیر سلول بر پایه کروموزن XTT سنجنش شد (۱۸). بدین ترتیب که ابتدا ترکیب جفت کننده الکترون تحت نام PMS با کروموزن XTT موجود در کیت مخلوط شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از مخلوط به هر یک از چاهک ها افزوده شد و پلیت به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایان شدت رنگ تشکیل شده در چاهک ها به وسیله دستگاه Eliza reader در طول موج ۴۹۲ نانومتر ثبت شد. تمامی مراحل ۵ مرتبه در فواصل زمانی مختلف تکرار شد. درصد رشد و تکثیر سلول (درصد سلول های زنده) در هر رقت دارو با استفاده از رابطه زیر تعیین شد:

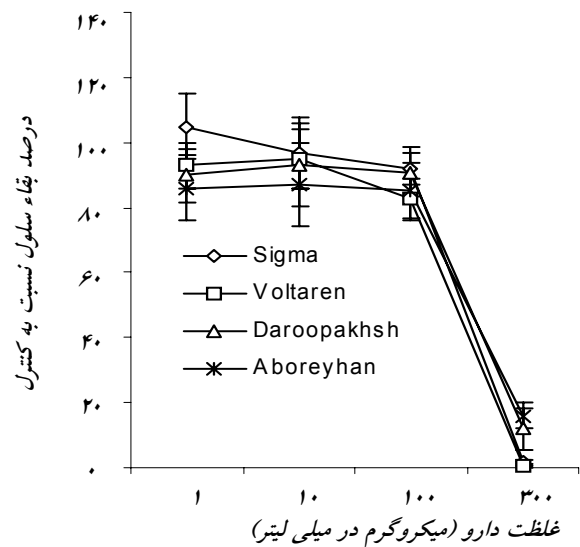
$$100 \times \frac{\text{شدت جذب بلانک} - \text{شدت جذب در حضور دارو}}{\text{شدت جذب بلانک} - \text{شدت جذب کنترل}}$$

ارزیابی اثر دیکلوفناک بر تمایز سلولی PC12: تمایز سلول PC12 با افزودن ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر NGF به محیط کشت به صورت گسترش نوریت های سلولی پدیدار می شود. در حالی که سلول در محیط کشت کامل بدون افزودن NGF خارجی تمایز نیافته باقی می ماند (۱۹). به منظور مطالعه اثر دیکلوفناک بر تمایز سلول PC12 ناشی از NGF، سوسپانسیون سلولی معادل ۵۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر در محیط

نمودار ۲).

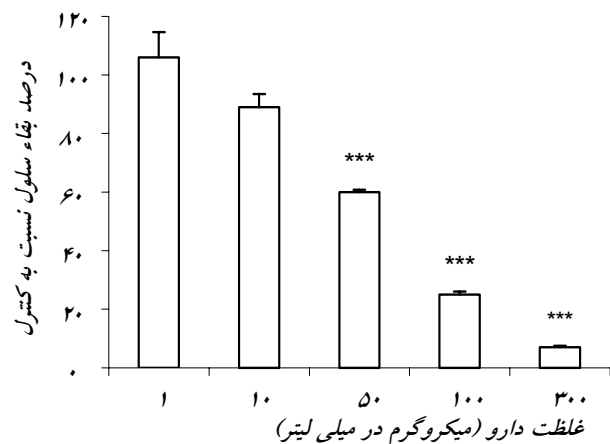
حضور غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داروها و NGF انکوبه شدند. سپس تمایز سلول با توجه به میانگین بلندترین طول نوریت‌های سلول بررسی شد.

میانگین بلندترین طول نوریت‌های سلول در غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دیکلوفناک داروپخش به ترتیب 166 ± 49 و 134 ± 42 میکرومتر، دیکلوفناک سیگما 160 ± 69 و 165 ± 68 میکرومتر و در محیط کشت کنترل 152 ± 52 میکرومتر اندازه‌گیری شد. دیکلوفناک با توجه به نتایج کسب شده، در رقت‌های سمی نیز قادر به افزایش یا کاهش تمایز سلول PC12 ناشی از NGF نبود (تصویر ۱). آنالیز آماری تفاوتی بین دیکلوفناک‌های سیگما و داروپخش نشان نداد.



نمودار ۱: اثر دیکلوفناک بر رشد سلول‌های PC12 در محیط کشت تکمیل شده Neurobasal

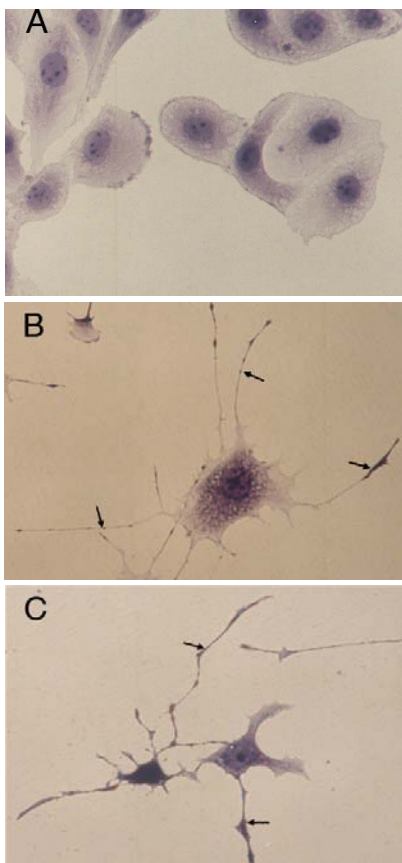
سلول‌ها با رقت‌های مختلف ژنریک‌های دیکلوفناک در محیط کشت تکمیل شده Neurobasal به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. در پایان رشد سلول با روش سنجش کروموزن XTT تعیین شد. داده‌ها به صورت $mean \pm SD$ ارائه شده‌اند.



نمودار ۲: اثر دیکلوفناک بر رشد سلول‌های PC12 در محیط کشت کامل DMEM/F12

سلول‌ها با رقت‌های مختلف دیکلوفناک (Sigma) در محیط کشت DMEM/F12 غنی شده با ۱۰ درصد FBS به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. رشد سلول در پایان با روش سنجش کروموزن XTT تعیین شد. داده‌ها به صورت $mean \pm SD$ ارائه شده‌اند ($P < 0.001 = ***$).

تأثیر دیکلوفناک ساخت شرکت داروسازی داروپخش و گرید شیمیایی ساخت کمپانی سیگما بر تمایز سلول PC12 ناشی از NGF بررسی شد. بدین منظور کشت‌های سلول در



تصویر ۱: اثرات دیکلوفناک بر تمایز سلولی ناشی از NGF در محیط کشت سلول‌های PC12 در حضور و عدم حضور دیکلوفناک در محیط کشت DMEM/F12 حاوی NGF به ترتیبی که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد، انکوبه شدند. نوک پیکان گسترش نوریت‌های سلولی را نشان می‌دهد.

(A) کشت کنترل بدون NGF، (B) محیط کشت حاوی NGF، (C) محیط کشت حاوی NGF و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دیکلوفناک رنگ آمیزی هماتوکسیلین، بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر

بحث

رده سلولی PC12 برخی از ویژگی‌های سلول‌های عصبی را در محیط کشت نشان می‌دهد و در مطالعات متعددی به عنوان مدل سلول عصبی استفاده شده است (۱۷). بنابراین در مطالعه حاضر سلول PC12 برای بررسی اثرات نوروتوکسیک دیکلوفناک انتخاب شد. سمیت دیکلوفناک بر سلول‌های PC12 در محیط کشت Neurobasal تکمیل شده در رقت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (معادل ۳۱۰ میکرومول) و در محیط کشت کامل DMEM/F12 در رقت بالاتر از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اعمال شد. دارو در رقت‌های سمی نیز تمایز سلولی ناشی از NGF را کاهش یا افزایش نداد.

دیکلوفناک پرمصرف‌ترین عضو خانواده NSAIDs است. شواهد متعدد متابولیت‌های فعال دارو، استرس اکسیداتیو، تداخل در عملکرد میتوکندری، کاهش ATP و در نهایت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را دلایل سمیت دیکلوفناک معرفی می‌کند (۱۵ و ۲۱-۱۲). Kudo و همکارانش اثر Naproxen، Ibuprofen (S)، و Indomethacin، آسپیرین و دیکلوفناک را بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی موش بررسی کردند (۲۲). دیکلوفناک در مطالعه فوق رشد و تمایز سلولی را در رقت ۱۰ μM مهار کرد. در حالی که بقیه داروها رشد سلول را افزایش دادند. کاهش سمیت دارو در مطالعه ما نسبت به نتایج این گروه با توجه به تفاوت نوع سلول و محیط کشت قابل بحث است. این گروه از سلول‌های بنیادی عصبی موش و محیط کشت DMEM/F12 تکمیل شده با انسولین، ترانس فرین، پروژسترون، سلنیت سدیم، عامل رشد اپیدرمی و عامل رشد فیروبلست بازی استفاده کردند. در حالی که در مطالعه جاری از سلول PC12 و دو محیط کشت Neurobasal تکمیل شده با مکمل B27 و DMEM/F12 تکمیل شده با ۱۰ درصد FBS استفاده شد.

تحقیقات ایجاد رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو را از دلایل سمیت دیکلوفناک دانسته‌اند (۱۵ و ۲۱-۱۲).

مکمل B27 حاوی مجموعه ترکیبات آنتی‌اکسیدان، ویتامین E، E acetate، superoxid dismutase، glutathione می‌باشد (۲۳) و بنابراین کاهش

سمیت دارو در حضور آنتی‌اکسیدان‌های مکمل B27 محتمل است. افزایش سمیت در محیط کشت DMEM/F12 علی‌رغم غنی کردن محیط با سرم جنینی، به احتمال فوق قوت می‌بخشد. نتایج ما با مطالعات قبلی که ایجاد رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو را از دلایل سمیت دارو دانسته و کاهش سمیت دارو را در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان نظیر ویتامین E و سوپراکسید دیسموتاز گزارش کرده‌اند، هماهنگ است (۱۲ و ۱۳ و ۲۰ و ۲۱). همچنین در همین ارتباط، Berenguer و همکارانش اثرات محافظتی عصاره گیاهی با نام شاه‌پسند قرمز را بر ضایعات ایجاد شده به وسیله دیکلوفناک در دستگاه گوارش موش صحرائی با خواص آنتی‌اکسیداتیو عصاره گیاه و افزایش آنزیم‌های glutathione peroxidase و superoxide dismutase مرتبط گزارش کرده‌اند (۲۴).

ژنریک‌های مختلف دیکلوفناک در مطالعه ما سمیت یکسانی از نظر آماری بر سلول‌های PC12 نشان دادند. مطالعات متعددی برای شناسایی دلایل سمیت شدید دارو در افراد خاص انجام شده است. دیکلوفناک توسط آنزیم‌های میکروزومی سیتوکروم P450 به متابولیت‌هایی که بعضاً سمیت بالایی نیز دارند، تبدیل می‌شود (۴). محققین سمیت دارو را با نحوه فعالیت کمی و کیفی آنزیم‌های سیتوکروم P و متابولیت‌های تولید شده در ارتباط می‌دانند (۴ و ۲۵ و ۲۶). فنوباریتال فعال‌کننده قوی آنزیم سیتوکروم P3A است. Wang و همکارانش نشان دادند که فنوباریتال هم‌زمان با افزایش متابولیزاسیون دیکلوفناک سمیت دارو را نیز در کشت سلول‌های هیپاتوسیت افزایش می‌دهد (۲۷). یافته‌های این گروه احتمال افزایش سمیت دیکلوفناک در صورت مصرف هم‌زمان با موادی که فعالیت آنزیم‌های سیتوکروم P را افزایش می‌دهند، مطرح کرده است. اتصال متابولیت‌های دارو به پروتئین‌های سلولی در نهایت به اختلال در عملکرد مسیرهای فیزیولوژیک سلول منتهی می‌شود (۲۸ و ۲۹). گلوکاتیون بخشی از سیستم سم‌زدایی سلول است که با اتصال به متابولیت‌های دارو نقش مهمی در حفاظت از تشکیلات مولکولی سلول به عهده دارد (۲۵). بنابراین در مطالعه حاضر گلوکاتیون موجود در مکمل B27 به عنوان یکی از دلایل اختلاف سمیت دارو در دو محیط کشت مطرح شده و در همین ارتباط، نقش

متابولیت‌های دیکلوفناک در سمیت دارو حداقل در مدل سلولی PC12 اهمیت می‌یابد.

تمایز سلول‌های PC12 در رقت‌های سمی دارو نیز متاثر نشد. بدین ترتیب که میانگین طول نوریت‌های سلولی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارو مشابه با کشت کنترل بود، در حالی که در این غلظت از دارو، آزمون XTT ۸۵ درصد کاهش رشد سلول را نشان می‌داد. بنابراین نتایج سمیت دارو بر سلول‌های عصبی را به صورت عمده از طریق تداخل در رشد و نه تمایز سلول معرفی می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه دلیل سمیت دیکلوفناک بر سلول‌های عصبی را به صورت عمده از طریق تداخل در رشد سلولی و نه تمایز سلولی معرفی کرده و استرس اکسیداتیو را به عنوان یکی از مکانیسم‌های سمیت دارو پیشنهاد می‌کند. پتانسیل آنتی‌اکسیداتیو و توان سم‌زدایی بافت احتمالاً در سمیت دیکلوفناک نقش دارد.

تشکر و قدردانی

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به طرح پژوهشی شماره ۸۰-۱۹/ع، مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان بود. بدین وسیله از آن مرکز پژوهشی تشکر می‌شود.

References

- 1) Sallmann AR. The history of diclofenac. *Am J Med.* 1986 28; 80(4B):29-33.
- 2) Laneuville O, Breuer DK, Dewitt DL, Hla T, Funk CD, Smith WL. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;271(2):927-934.
- 3) Brogden RN, Heel RC, Pakes GE, Speight TM, Avery GS. Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. *Drugs.* 1980;20(1):24-48.
- 4) Tang W, Stearns RA, Wang RW, Chiu SHL, Baillie TA. Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12 (2):192-199.
- 5) Rynestad T, Kvam AM. Streptococcal myositis and tissue necrosis with intramuscular administration of diclofenac. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1995;39(8):1128-1130.
- 6) Pillans PI, O'Connor N. Tissue necrosis and necrotizing fasciitis after intramuscular administration of diclofenac. *Ann Pharmacother.* 1995; 29(3): 264-6.
- 7) Giovannetti M, Machado MA, Borrelli Junior M, Ikejiri CI, Alonso N, et al. Tissue necrosis: a side effect of sodium diclofenac: report of cases and discussion of the physiopathology. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1993;48(1):39-42.
- 8) Jick SS, Kaye JA, Jick H. Diclofenac and acute myocardial infarction in patients with no major risk factors. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;64(5):662-7.
- 9) Sen C, Erdem M, Gunes T, Koseoglu D, Filiz NO. Effects of diclofenac and tenoxicam on distraction osteogenesis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007;127(3):153-9.
- 10) Banks AT, Zimmerman HJ, Ishak KG, Harter JG. Diclofenac-associated hepatotoxicity: analysis of 180 cases reported to the Food and Drug Administration as adverse reactions. *Hepatology.* 1995;22(3):820-7.
- 11) Boelsterli UA, Zimmerman HJ, Kretz-Rommel A. Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: molecular mechanisms and pathology. *Crit Rev Toxicol.* 1995; 25(3):207-35.
- 12) Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell JV, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(11):2155-67.
- 13) Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Jover R, Castell JV. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 2003;17(5-6):675-80.
- 14) Hickey EJ, Raje RR, Reid VE, Gross SM, Ray SD. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(2):139-52.
- 15) Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in rheumatoid synovial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(1):18-25.
- 16) Cheraghali AM. Injectable diclofenac: a painful shot into Iran's health system. *Soc Sci Med.* 2006;63(6):1597-601.
- 17) Cao X, Shoichet MS. Defining the concentration gradient of nerve growth factor for guided neurite outgrowth. *Neuroscience.* 2001;103(3):831-40.
- 18) Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods.* 1991; 142(2):257-65.
- 19) Isom GE, Borowitz JL. PC-12 cells. In: Tyson CA, Frazier JM. (Eds.). *Methods in Toxicology.* vol 1A. Academic Press. New York. 1993; pp: 82-93.
- 20) Cantoni L, Valaperta R, Ponsoda X, Castell JV, Barelli D,

- Rizzardini M, et al. Induction of hepatic heme oxygenase-1 by diclofenac in rodents: role of oxidative stress and cytochrome P-450 activity. *J Hepatol*. 2003;38(6):776-83.
- 21) Inoue A, Muranaka S, Fujita H, Kanno T, Tamai H, Utsumi K. Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome and caspase pathway. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(8):1290-9.
- 22) Kudo C, Kori M, Matsuzaki K, Yamai K, Nakajima A, Shibuya A, et al. Diclofenac inhibits proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biochem Pharmacol*. 2003; 66(2):289-95.
- 23) Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*. 1993;35(5):567-76.
- 24) Berenguer B, Sánchez LM, Quílez A, López-Barreiro M, de Haro O, Gálvez J, et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *J Ethnopharmacol*. 2006;103(2):194-200.
- 25) Shen S, Marchick MR, Davis MR, Doss GA, Pohl LR. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem Res Toxicol*. 1999; 12(2):214-22.
- 26) Tang W, Stearns RA, Bandiera SM, Zhang Y, Raab C, Braun MP, et al. Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab Dispos*. 1999; 27(3):365-72.
- 27) Wang AG, Xia T, Yuan J, Yu RA, Yang KD, Chen XM, et al. Effects of phenobarbital on metabolism and toxicity of diclofenac sodium in rat hepatocytes in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2004;42(10):1647-53.
- 28) Kretz-Rommel A, Boelsterli UA. Diclofenac covalent protein binding is dependent on acyl glucuronide formation and is inversely related to P450-mediated acute cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993;120(1):155-61.
- 29) Kretz-Rommel A, Boelsterli UA. Mechanism of covalent adduct formation of diclofenac to rat hepatic microsomal proteins. Retention of the glucuronic acid moiety in the adduct. *Drug Metab Dispos*. 1994; 22(6):956-61.