Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday November 18th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ)
Summer 2010; 13(2): 9-16

Original Article

The effect of α- tocopherol and lovastatin on apoptosis induction in human colorectal carcinoma cell line

Arast Y[1], Galedari H[2], Solgui R[3], Kalantari H[4], Rezaei M[5*]

1-Instructor, Msc of Toxicology, Department of Occupational Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
2- Associate professor, PhD of Genetics, Department of Genetics, Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Resident of Toxicology, Department of Toxicology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Professor, PhD of Toxicology, Jundishapur University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
5- Assistant Professor, PhD of Toxicology, Department of Toxicology, Jundishapur University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received 3 Dec 2010 Accepted 17 March 2010

Abstract

Background: Colorectal cancer is one of the most important and most common fatal types of cancer in the world. Identifying new agents which individually or in combination with other agents induce apoptosis in tumor cells is surely of great significance in treatment of colon cancer. The aim of the present study was to assess the effectiveness of applying lovastatin and α-tocopherol individually or in combination with each other in the induction of apoptosis in human colorectal cancer cells.

Materials and Methods: In this trial, HT29 cells were exposed to various concenterations of lovastatin (5, 10, and 20 µmol) and/or alpha tocopherol (10, 20, and 25, and 30 µmol). After cell count, these cells were examined through trypan blue method and DNA fragmentation technique.

Results: The findings of DNA fragmentation technique showed that each of the two drugs could induce apoptosis at all of the given concentrations. In the combination of 10 µmol concentration of lovastatin and 5 and 10 µmol concentrations of α-tocopherol, induction of apoptosis was not observed.

Conclusion: Based on the extensive effects of statins, the concentration of lovastatin is seen as determining in its apoptosis function, and its combination with tocopheroles in high concentrations, by inducing apoptosis, can provide novel effective strategies for prevention of human colorectal cancer.

Keywords: Cell death, Colorectal Cancer, Lovastatin, Tocopherol

*Corresponding author:
Email: rezaei.mohsen@gmail.com
Address: Faculty of Pharmacy, Jundishapur University of Medical Sciences, Golestan Blv., Ahvaz, Iran

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 13، شماره 2 (شماره پیاپی 51)، تابستان 1389، 16-9

اثر آلفاتوکوفرول و لواستاتین در القاء مرگ سلولی در رده سلول سرطان کولون انسانی

یلدا ارست[1]، دکترحمید گله داری[2]، رضا سلگی[3]، دکتر هیبت اله کلانتری[4]، دکترمحسن رضایی[5*]

1- مربی، کارشناس ارشد سم شناسی، گروه بهداشت حرفه ای، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

2- دانشیار، دکترای ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

3- دستیار سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

4- استاد، دکترای سم شناسی، گروه سم شناسی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

5- استادیار، دکترای سم شناسی، گروه سم شناسی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت 88/9/12، تاریخ پذیرش 88/12/26

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین سرطان‌های منجر به مرگ در جهان می‌باشد. مسلماً تعیین عوامل جدیدی که بتوانند به تنهایی و یا به طور ترکیبی با یکدیگر باعث القای آپوپتوز در سلول‌های تومور شوند در درمان سرطان کولون حایز اهمیت است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثربخشی کاربرد جداگانه و ترکیبی لوواستاتین و آلفا توکوفرول در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولورکتال انسانی می‌باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های HT29 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف آلفا توکوفرول (5، 10 و 20 میکرو مولار) و لوواستاتین (10، 20، 25 و 30 میکرو مولار) قرار گرفتند. پس از شمارش سلولی با استفاده از روش تریپان بلو و تکنیک DNA فراگمانتاسیون جهت ارزیابی مرگ سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج حاصل از بررسی با تکنیک DNA فراگمانتاسیون نشان داد که دو دارو به تنهایی در تمام غلظت‌ها می‌توانند مرگ سلولی ایجاد کنند. در ترکیب غلظت 10 میکرومولار لواستاتین همراه با غلظت‌های 5 و 10 میکرو مولار آلفا توکوفرول القای مرگ سلولی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات گستردهٔ استاتین‌ها، غلظت لواستاتین در مکانیسم مرگ زایی آن مؤثر بوده و ترکیب آن با توکوفرول در غلظت‌های بالا با ایجاد مرگ سلولی می‌تواند فراهم کننده استراتژی‌های نوین و مؤثر در مهار سرطان کولورکتال انسانی باشد.

واژگان کلیدی: مرگ سلولی، سرطان کولورکتال، لواستاتین، توکوفرول

***نویسنده مسئول:** اهواز، بلوار گلستان، دانشگاه جندی شاپور، دانشکده داروسازی

Email: rezaei.mohsen@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقدمه

تومور مجموعه‌ای از سلول‌هاست که به دلیل رشد و تقسیم خارج از کنترل سلول‌ها ایجاد می‌شود. سلول‌های تومور از جهات مختلفی از جمله کنترل رشد، شکل ظاهری، ویژگی‌های غشایی، ترشحات پروتئینی و بیان ژن با سلول‌های طبیعی تفاوت دارند. بعضی از بیماری‌ها با اختلال در تنظیم آپوپتوز به وجود می‌آیند. سرطان از جمله این بیماری‌هاست که با کاهش آپوپتوز ایجاد می‌شود. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، به مرگ سلول‌ها نه به صورت تصادفی بلکه به صورت کاملا کنترل شده توسط مکانیسم‌های سلولی اطلاق می‌شود. آپوپتوز یک فرایند فعال و تعریف شده است که نقش مهمی در گسترش ارگانیسم‌های چند سلولی دارد و عامل تنظیم و حفظ جمعیت سلول‌ها در بافت‌ها بر اساس موقعیت‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی آنها می‌باشد. در سلول‌هایی که با موتاسیون ایجاد می‌شوند تنظیم سیگنال‌های نرمال سلولی دچار اختلال شده، منجر به رشد و تکثیر بیش از حد سلول‌ها می‌شوند. در حالت طبیعی سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌گردند ولی در سلول‌های سرطانی موتاسیون از آپوپتوز سلول‌ها جلوگیری کرده ، تکثیر مهار نشده و بیماری به سمت تشکیل تومور پیش می‌رود. اخیراً محققان تلاش دارند که پروسهٔ سرطان را از طریق تغییراتی در خواص بیولوژیکی سلول و از دست دادن توانایی رشد و تقسیم این سلول‌ها مهار کنند. در این بین مداوا بر اساس تمایز سلول‌های تومور و القای آپوپتوز مناسب به نظر می‌رسد(1). استاتین‌ها یا مهارکنندگان آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل کوانزیم آ ردوکتاز، داروهایی بسیار مفید و موفق در درمان بیماری‌های کاردیو واسکولار می‌باشند. امروزه محققان یافته‌اند که استاتین‌ها دارای فعالیت‌های آنتی تومور نیز می‌باشند و تلاش دارند که از این داروها به همراه سایر عوامل شیمی درمانی در کنترل سرطان استفاده کنند(2). از طرفی ظرفیت ویتامین E به ویژه آلفا توکوفرول برای از بین بردن آسیب رادیکالی آزاد، القای آپوپتوز و تحریک بیان انکوژن‌ها این ویتامین را به گزینه‌ای مناسب جهت شیمی درمانی سرطان تبدیل کرده است. بر اساس مطالعات پاراکلینیکی ویتامین E ممکن است یک پاسخ ایمنی آنتی تومور، به وسیله القاء شیمیوتاکسی‌های ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها، به محل تومور ایجاد نماید(3)؛ این پاسخ ممکن است در نتیجه فعال کردن فاکتورهای آنتی تومور شامل فاکتورهای نکروزکننده تومور آلفا و بتا و P_{53} و یا مهار پروتئین کینازC باشد(4، 5).

امروزه سرطان کولورکتال به عنوان یکی از سرطان‌های منجر به مرگ در جوامع غربی وامریکایی شناخته شده است و محققان توجه بیشتری به پدیده آپوپتوز به عنوان عاملی اثر گذار درکنترل و مهار رشد این نوع تومور معطوف داشته‌اند. به نظر می‌رسد شناخت مسیرهای متفاوت القای آپوپتوز می‌تواند منجر به افزایش روند آن در سلول‌های سرطانی با استفاده از تأثیرات سینرژیستیکی عوامل محافظت کنندهٔ شیمیایی مختلف شود(6). با توجه به این فرضیه هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثربخشی کاربرد جداگانه و ترکیبی لواستاتین و آلفا توکوفرول در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولورکتال انسانی می‌باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه آزمایشگاهی رده سلول سرطانی کولورکتال انسانی HT29 از موسسه انستیتو پاستور تهران خریداری گردید، سلول‌های HT29 به مدت 10 روز مورد پاساژ قرار گرفتند، در طول این مدت مرتباً به وسیله میکروسکوپ فاز معکوس بررسی شدند. از آنجایی که با استناد به مقالات تعداد 106 سلول جهت تیمار با غلظت‌های مختلف داروها لازم بود، بنابراین پس از شمارش سلولی تعداد سلول‌ها را در هر میلی لیتر از محیط کشت به تعداد 106 سلول رسانیده و به هر خانه از پلیت های well 6 در زیر هود و محیط استریل منتقل شدند. زمان لازم برای تاثیر داروها بر روی سلول‌های HT29 بر اساس مقالات 14 ساعت و انیزومایسین به عنوان کنترل مثبت 2 ساعت بیان شده بود که بر این اساس عمل شد. بعد از اتمام زمان دارو دهی جهت بررسی توان زیستی سلول‌های HT29 شمارش با تریپان بلو انجام شد، سپس سلول‌های مورد مطالعه جهت بررسی میزان آپوپتوز القاء شده توسط داروها با تکنیک DNA فراگمنتاسیون مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله استخراج فنلی قطعات DNA بوسیله آگارز الکتروفورز، جهت لیز شدن غشاء سلول‌ها و جداشدن آنها از سطح پلیت‌ها به هر well، 0/5 میکرولیتر PBS و 55 میکرولیتر

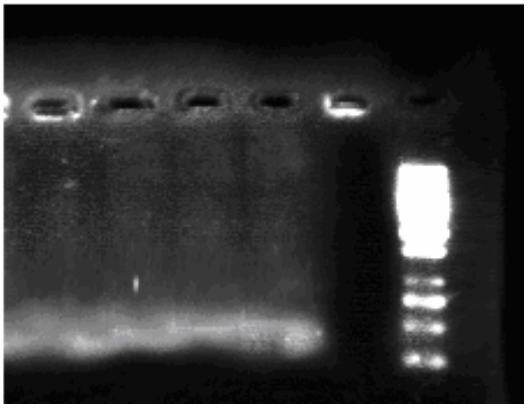
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday November 18th 2017

Lysis buffer اضافه کرده و به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس محلول حاصل به میکروتیوب منتقل شده، به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با دور 12000 g سانتریفوژ گردید، محلول رویی به میکروتیوب‌های جدید منتقل، 555 میکرولیتر فنل کلروفرم به آنها اضافه شده و 5 دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول حاصل را به لوله فالکون منتقل کرده و سپس 1100 میکرولیتر اتانول و 55 میکرولیتر آمونیوم استات به آن اضافه گردید، پس از 5 دقیقه سانتریفوژ محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب حاصل 30 میکرولیتر RNase و 30 میکرولیتر بافر TE اضافه گردید، سپس نمونه‌ها با استفاده از ورتکس برای مرحله الکتروفورز هموژن شدند؛ در ادامه مقدار 5 میکرولیتر از نمونه‌های هموژن شده با 2 میکرولیتر از بافر بارگیری (loading) مخلوط گردید و در چاهک‌های مخصوص ژل آگارز (1/2 درصد) ریخته شد. نمونه‌ها در سمت قطب منفی (کاتد) قرارگرفتند زیرا جهت حرکت DNA از قطب منفی به قطب مثبت می‌باشد. در هر ژل جهت کنترل کیفی یکی از چاهک‌ها به کنترل مثبت و یکی نیز به کنترل منفی اختصاص داده شد. همچنین 1 میکرولیتر مارکر 100 bp در درون چاهک مخصوص خود برای بررسی قطعات آپوپتوتیک قرار گرفت. در ادامه تانک مخصوص الکتروفورز به دستگاه Power supply ابتدا با ولتاژ 5 ولت به مدت 5 دقیقه و سپس 100 ولت به مدت 20 دقیقه متصل گردید. بعد از مشاهده حالت اسمیر مورد نظر با استفاده از دستگاه Gel Documentation عکس‌برداری صورت گرفت. توان زیستی سلول‌ها (Viability) از فرمول "100 × تعداد کل سلول‌ها / تعداد سلول‌های زنده = توان زیستی سلول‌ها" محاسبه شد.

یافته ها

قبل از انجام DNA فراگمانتاسیون به منظور بررسی توان زیستی سلول‌ها شمارش سلولی به وسیله لام نئوبار انجام شد. تعداد سلول‌های زنده در هر میلی لیتر برابر 868000، تعداد سلول‌های مرده در هر میلی لیتر برابر 72000 و تعداد کل سلول‌ها در هر میلی لیتر برابر 940000 عدد بود؛ بنابراین توان زیستی سلول‌ها برابر با 92/3 درصد محاسبه شد.

سلول‌های تیمار شده با آلفا توکوفرول و لوواستاتین به وسیله تکنیک ژل الکتروفورز برای تشخیص DNA فراگمانتاسیون و القای آپوپتوز بررسی شدند. در این روش فراگمنت‌های DNA ناشی از آپوپتوز چون وزن کمتری نسبت به ژنوم دارند تحت تاثیر اختلاف پتانسیل با سرعت بیشتری حرکت کردند و در مقایسه با مارکر 1000bp حدود باند 200bp این قطعات قرار گرفتند. در این ناحیه حالت اسمیر به صورت هاله‌ای مشاهده شد. البته شدت نور نمی‌تواند مقدار القای آپوپتوز را نشان دهد. اساس نتیجه گیری در این روش مقایسه نمونه‌های مختلف با کنترل منفی می‌باشد. اگر نمونه مانند کنترل منفی باشد آپوپتوز القاء نشده ، در غیر این صورت آپوپتوز القا شده است. همان طور که شکل 1 نشان می‌دهد، در همه غلظت‌های آلفا توکوفرول آپوپتوز القا شده است. مقایسه نتایج شکل 2 نشان داد که در اثر غلظت همزمان 10 میکرومولار لواستاتین با غلظت‌های 10 و 5 میکرومولار آلفا توکوفرول آپوپتوز القا نشده و در بقیه موارد این فرایند القا شده است(شکل 3 و 4).

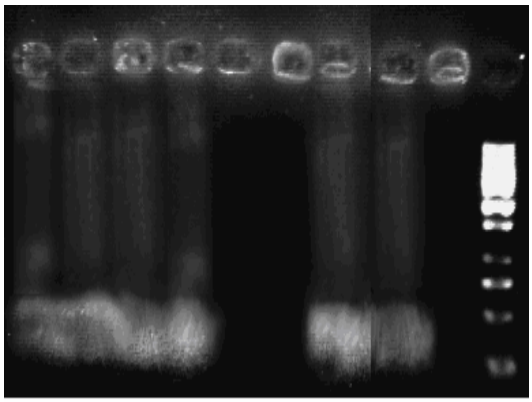


شکل 1. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت های مختلف داروها، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید.

از راست به چپ به ترتیب:

1- مارکر 100 bp
2- کنترل منفی
3- کنترل مثبت
4- توکوفرول 5 میکرومولار
5- توکوفرول 10 میکرومولار
6- توکوفرول 20 میکرومولار

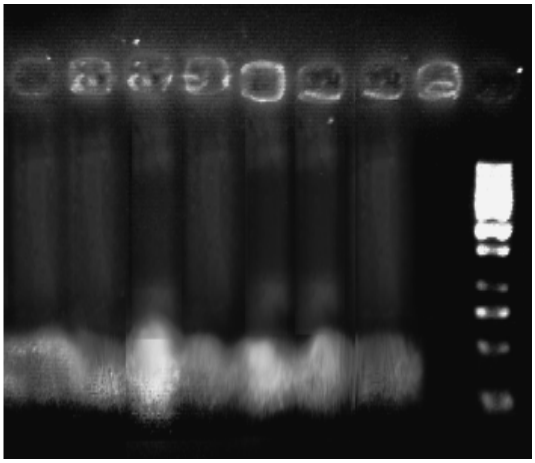
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday November 18th 2017



شکل 2. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت های مختلف داروها ، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید (هر غلظت 3 بار تکرار شده است).

از راست به چپ به ترتیب:

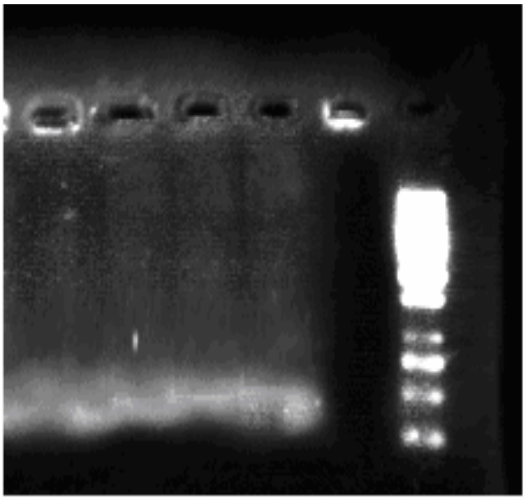
1- مارکر 100 bp
2- کنترل منفی
3- کنترل مثبت
4- لواستاتین 10 میکرومولار+ توکوفرول 20 میکرومولار
5- لواستاتین 10 میکرومولار+ توکوفرول 10 میکرومولار
6- لواستاتین 10 میکرومولار+ توکوفرول 5 میکرومولار
7- لواستاتین 30 میکرومولار
8- لواستاتین 25 میکرومولار
9- لواستاتین 20 میکرومولار
10- لواستاتین 10 میکرو مولار



شکل 3. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت های مختلف داروها ، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید (هر غلظت 3 بار تکرار شده است).

از راست به چپ به ترتیب:

1- مارکر 100 bp
2- کنترل منفی
3- کنترل مثبت
4- لواستاتین 30 میکرومولار+ توکوفرول 10 میکرومولار
5- لواستاتین30 میکرومولار+ توکوفرول 5 میکرومولار
6- لواستاتین30 میکرومولار+ توکوفرول 20 میکرومولار
7- لواستاتین 25 میکرومولار+ توکوفرول 10 میکرومولار
8- لواستاتین 25 میکرومولار+ توکوفرول 5 میکرومولار
9- لواستاتین25 میکرومولار+ توکوفرول 20 میکرومولار



شکل 4. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت های مختلف داروها ، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید (هر غلظت 3 بار تکرار شده است).

از راست به چپ به ترتیب:

1- مارکر 100 bp
2- کنترل منفی
6- لواستاتین20 میکرومولار+ توکوفرول 20 میکرومولار
3- کنترل مثبت
4- لواستاتین20 میکرومولار+ توکوفرول 5 میکرومولار
5- لواستاتین20 میکرومولار+ توکوفرول 10 میکرومولار
6- لواستاتین20 میکرومولار+ توکوفرول 20 میکرومولار

بحث

برای بررسی آپوپتوز تکنیک‌های مختلفی مانند سنجش توان زیستی سلول‌ها با MTT Assay ، سنجش آپوپتوز به وسیله انکزین V و یدید پروپیدیوم، سنجش آپوپتوز با استفاده از DNA فراگمنتاسیون و فلوسیتومتری، تست TUNEL جهت تشخیص DNA فراگمنتاسیون،

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday November 18th 2017

اندازه‌گیری مرگ سلولی به وسیله تریپان بلو و استخراج فنلی قطعات DNA بوسیله آگارز الکتروفورز مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش استخراج فنلی قطعات DNA به وسیله آگارز الکتروفورز شکل اصلاح شده روش کلاسیک است که در سال 1980 به وسیله ویلی به کار گرفته شد. محصولات حاصل از این روش خیلی خالص و قطعات DNA عاری از پروتئین می‌باشند. بر اساس این که فراگمانتاسیون DNA تنها در آپوپتوز دیده می‌شود، در این مطالعه با توجه به امکانات موجود از این روش برای تشخیص این فرایند استفاده شده است؛ البته جهت تعیین توان زیستی سلول‌ها تست تریپان بلو به کار گرفته شد. نفوذ تریپان بلو به داخل غشاءهای سالم اساس این آزمایش می‌باشد. سلول‌های زنده و سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز می‌باشند از غشاء سالم برخودار بوده در زیر میکروسکوپ بی رنگ مشاهده می گردند؛ درحالی که سلول‌های نکروتیک و سلول‌هایی که در مراحل پایانی آپوپتوز می‌باشند در اثر نفوذ رنگ، آبی دیده می‌شوند(6).

فعالیت ضد سرطان آنتی اکسیدان‌های موجود در رژیم غذایی مانند توکوفرول‌ها و کاروتنوئیدها در بسیاری از مطالعات کلینیکی اثبات و منتشر شده است. آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند باعث تحریک سلول‌های سیستم ایمنی برای مستقر شدن در محل تومور و از بین بردن سلول‌های آن و یا مهار آنژیوژنز شوند(7). همچنین این مواد باعث بیان گسترده ژن P_{53} می‌شوند که فرآورده سرکوب کننده سلول‌های تومور است؛ احتمالاً این روند اصلیترین مکانیسم جهت فعالیت ضد سرطان آنتی اکسیدان‌ها از جمله ویتامین E است(6). این ویتامین به خصوص آلفا توکوفرول سوکسینات به طور شگفت آوری در سرطان پروستات و سینه اثر ضد توموری دارد در حالی که آپوپتوز را در سلول‌های نرمال اپیتلیال القا نمی‌کند(5). در مطالعه حاضر آلفا توکوفرول در همه غلظت‌ها آپوپتوز را در سلول‌های HT29 القا کرده است. این غلظت ها بر اساس مرور مقالات انتخاب شدند با این حال بالاترین غلظت مورد استفاده 20 میکرو مولار بسیار کمتر ازمقداری است که که دراثر مصرف ویتامین E (400 واحد روزانه) در پلاسما یا بافت‌ها یافت می‌شود. بررسی نشان داده است که با مصرف این ویتامین به مقدار 400 واحد به صورت روزانه سطح سرمی و بافتی ویتامین E به صورت زیر خواهد بود(7):

R= Ct / CP ، معمولاً در مورد داروهای محلول در چربی R=10 است، بعد از مصرف ویتامین E با مقدار 400 واحد، CP برابر 25 تا 30 میکرومولار است بنابر این Ct برابر 250 تا 300 میکرومولار می باشد.

با وجود این که غلظت‌های مورد استفاده کمتر از غلظت‌های داخل بدن بوده‌اند، ولی به خوبی توانسته‌اند القاکننده مرگ سلولی باشند. این موضوع را می‌توان از چند جنبه بررسی کرد؛ ویتامین E نفوذپذیری غشایی بیشتری در سلول‌های سرطانی دارد که این مسئله در مورد سلول‌های HT29 هم می‌تواند صادق باشد. نتایج مطالعه شکلار در سال 1998 نیز تأییدی بر این یافته می‌باشد(7، 8)؛ همچنین در بررسی‌های آزمایشگاهی و کشت سلولی محیط اثر دارو با بدن متفاوت می‌باشد. در محیط آزمایشگاه فاکتورهای موثر بر رشد سلولی که حاصل ترشح از سلول‌های دیگر هستند کمتر می‌باشد. هر چند ویتامین E با اثر شیمیوتاکسی خود در مراحل اولیه می‌تواند مرگ سلولی را در سلول‌های نئوپلاسمیک القا نماید با این حال به دلیل سیر مزمن سرطان و التهاب خفیف و مزمنی که بدین ترتیب ایجاد می‌شود اثر ویتامین E در داخل بدن کمتر می‌شود(9).

از طرف دیگر با توجه به بررسی‌های سالگانیک در سال 2002 مصرف ویتامین E در افراد سیگاری پتانسیل ابتلا به سرطان ریه را افزایش می‌دهد. در افرادی که سیگاری هستند مواد کاسینوژن حاصل از سیگار به وسیله ویتامین E قابل حذف نیستند؛ با این حال ویتامین E در این افراد گونه‌های فعال اکسیژن را جمع‌آوری می‌نماید. به دلیل حضور کارسینوژن‌ها سلول‌ها دچار آسیب شده و گونه های فعال اکسیژن بالا می‌رود که خود عاملی برای ایجاد مرگ سلولی است(10). در این حالت اثر جاروکنندگی ویتامین E مانع اثر گونه‌های فعال اکسیژن در القاء مرگ سلولی می‌گردد؛ از طرف دیگر به نظر می‌رسد مهم‌ترین مکانیسم

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday November 18th 2017

عملکرد استاتین‌ها در برابر سرطان مهار تشکیل کلسترول و تغییر ترکیب غشاء است که باعث فعال شدن فاکتورهای پروآپوپتوتیک همچون کاسپاز3 و القاء مرگ سلولی می‌شود(11، 12). استاتین‌ها به صورت وابسته به دوز می‌توانند موجب پروتئولیز لامین B (پروتئین غشاء اسکلتی هسته) و القاء آپوپتوز شوند(12، 13). در مطالعه ای اثر لواستاتین بر سلول‌های سرطانی تیروئید و پروستات مشاهده شده است؛ لواستاتین باعث القای فعالیت‌های پرو آپوپتوتیک در این سلول‌ها می‌گردد(11).

نتایج این مطالعه نشان داده است که با مجاورت لواستاتین تنها در پایین‌ترین غلظت یعنی 10میکرو مولار با غلظت‌های 5 و 10 میکرو مولار آلفا توکوفرول آپوپتوز مشاهده نمی‌شود. در واقع لواستاتین در این غلظت‌ها نوعی اثر مهاری بر عملکرد آلفا توکوفرول داشته است؛ احتمالاً می‌توان چنین نتیجه گرفت که کاربرد این دو دارو در غلظت‌های بالا در کنار هم باعث افزایش فعالیت کاسپاز 3 و نهایتاً القای سینرژیستیکی آپوپتوز می‌شود. در این زمینه اسوامی و همکاران در مطالعه‌ای غلظت‌های 30-5 میکرو مولار لواستاتین را بر روی سلول‌های HT29 مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج آنها آپوپتوز در غلظت‌های 5 و 10 میکرو مولار دیده نشد. با توجه به مکانیسم پیشنهادی آنها (بالا رفتن غلظت لامین B در سلول و افزایش فعالیت کاسپاز3) به نظر می‌رسد در غلظت‌های پایین لواستاتین، غلظت لامین B در حدی نیست که بتواند به طور مؤثری کاسپاز3 را فعال کند(2)؛ بنابراین لواستاتین در غلظت‌های مختلف، ظاهراً از طریق مکانیسم‌های مختلفی اثرات پروآپوپتوتیک خود را القا می‌نماید. این مسئله در کاربرد هم‌زمان دوزهای لواستاتین و توکوفرول به گونه‌ای دیگر خود را نشان داده است. طبق نتایج استفاده هم‌زمان این دو موجب شده است تا در غلظت‌های 5 و 10 میکرو مولار توکوفرول در ترکیب با غلظت 10میکرو مولار لواستاتین مرگ سلولی مشاهده نشود. لواستاتین با مهار فارنزیلاسیون ras موجب بهبود فعالیت P_{53} و در نهایت مهار رشد تومور می‌شود(2). با توجه به مکانیسم مورد نظر برای فعالیت ضد توموری توکوفرول که شامل افزایش بیان ژن P_{53} و کاهش بیان ras می‌باشد پیش بینی می‌شود ترکیب لواستاتین و توکوفرول بتواند اثرات مرگ زایی آنها را بر روی سلول‌های HT29 افزایش دهد. این پیش بینی در دوزهای بالای لواستاتین و توکوفرول اتفاق افتاده اما در دوزهای پایین عکس آن رخ داده است. بر اساس برخی مطالعات استاتین‌ها در دوزهای پایین باعث مهار سلول‌های T ایمنی می‌شوند(12، 13)؛ از طرف دیگر توکوفرول با تحریک سلول‌های ایمنی و ترشح سیتوکاینها موجب مهار تومور می‌شود(7). با توجه به یافته‌های این پژوهش به نظر می‌رسد مهار ترشح سیتوکین‌ها و اثرات سرکوب کنندگی سیستم ایمنی لواستاتین در دوزهای پایین تا حدی توجیه کننده مشاهدات باشد؛ به عبارت دیگر احتمالاً تحریک وفعال شدن مسیر خارجی القاء مرگ سلولی توسط توکوفرول ایجاد می‌گردد که لواستاتین با مکانیسم‌های گفته شده در دوز پایین مانع از آن می‌شود. آنچه از بررسی نتایج این مطالعه به دست می‌آید این است که لواستاتین در غلظت‌های مختلف دارای مکانیسم‌های متفاوتی برای القاء مرگ سلولی است. در غلظت10میکرو مولار مکانیسم القاء مرگ سلولی توسط توکوفرول مهار شده است در صورتی که با بالا رفتن غلظت (20 میکرو مولار) یا مهار مربوطه برداشته می‌شود یا این که مکانیسم‌های دیگری از جمله افزایش غلظت لامین B و فعالیت کاسپاز 3 به حدی می‌رسد که می‌تواند سلول را در فرایند مرگ وارد کند.

نتیجه گیری

تجویز ویتامین E به همراه لوواستاتین موجب القاء مرگ سلولی در غلظت‌های بالای آن می‌گردد. با توجه به نتایج این تحقیق، جهت تعقیب اثرات درمانی مطلوب‌تر و کاهش عوارض جانبی ناشی از شیمی درمانی سرطان می‌توان از دوزهای ترکیبی لوواستاتین و توکوفرول در سرطان کولون استفاده نمود. قطعاً بررسی‌های تکمیلی در این خصوص گامی مؤثردر پیشبرد کنترل سرطان و کاهش پیچیدگی‌های ناشی از آن خواهد بود.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:33 +0330 on Saturday November 18th 2017

تشکر و قدر دانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مصوب کارشناسی ارشد دوره سم شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه جندی شاپور اهواز می‌باشد. بدینوسیله از زحمات فراوان معاونت محترم پژوهشی دانشگاه به دلیل تأمین منابع مالی این این طرح، اساتید بزرگوار و فرزانه گروه سم شناسی و فارماکولوژی دانشکده داروسازی به دلیل حمایت های دلسوزانه ایشان، ریاست محترم وقت دانشکده داروسازی جناب آقای دکتر مقیمی پور به دلیل مساعدت های بی دریغ و صمیمانه ایشان و پرسنل محترم پژوهشی و آموزشی دانشکده داروسازی به دلیل همکاری مؤثر خود کمال تشکر و قدردانی را می نماییم.

منابع

1. Sun S, Hail NJ, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. J Natl Cancer Inst. 2004 May;96(9):662-72.
2. Swamy M, Cooma I, Reddy B, Rao C. Lamin B, caspase-3 activity, and apoptosis induction by a combination of HMG-CoA reductase inhibitor and COX-2 inhibitors: a novel approach in developing effective chemopreventive regimens. Int J Oncol. 2002 Apr;20(4):753-9.
3. Shklar G, Schwartz J. Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alphatocopherol, beta-carotene, canthaxanthin and algae extract. Eur J Cancer Clin Oncol. 1988 May;24(5):839-50.
4. Schwartz J, Antoniades D, Zhao S. Molecular and biochemical reprogramming of oncogenesis through the activity of prooxidants and antioxidants. Ann N Y Acad Sci. 1993 May;686:262-78; discussion 78-9.
5. Israel K, Yu W, Sanders B, Kline K. Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis. Nutr Cancer. 2000;36(1):90-100.
6. Zhivotosky B, Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. Curr Protoc Cell Biol. 2001 Nov;Chapter 18:Unit 18.3.
7. Shklar G. Mechanisms of cancer inhibition by anti-oxidant nutrients. Oral Oncol. 1998 Jan;34(1):24-9.
8. Dimitrov N, Meyer-Leece C, McMillan J, Gilliland D, Perloff M, Malone W. Plasma alpha-tocopherol concentrations after supplementation with water- and fat-soluble vitamin E. Am J Clin Nutr. 1996 Sep;64(3):329-35.
9. Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Sep;90(17):7915-22.
10. Salganik R. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. J Am Coll Nutr. 2001 Oct;20(5 Suppl):464S-72S; discussion 73S-75S.
11 .Di Matola T, D'Ascoli F, Luongo C, Bifulco M, Rossi G, Fenzi G, et al. Lovastatin-induced apoptosis in thyroid cells: involvement of cytochrome c and lamin B. Eur J Endocrinol. 2001 Nov;145(5):645-50.
12. Coogan P, Smith J, Rosenberg L. Statin use and risk of colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 2007 Jan;99(1):32-40.
13. Ajith T, Harikumar K, Thasna H, Sabu M, Babitha N. Proapoptotic and antitumor activities of the HMG-CoA reductase inhibitor, lovastatin, against Dalton's lymphoma ascites tumor in mice. Clin Chim Acta. 2006 Apr;366(1-2):322-8.