مقاله پژوهشی
(Original Article)

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهارم ـ شماره اول ـ بهار ۸۹
صفحات ۳ الی ۹

اثر سلکاکسیب و آلفا توکوفرول در القای مرگ سلولی در رده‌ی سلول سرطان کولون انسانی

رضا سلگی[۱]، هیبت‌اله کلانتری[۲]، یلدا ارست[۳]، مسعودرضا سیفی[۴]، حمید گله‌داری[۵]، محسن رضایی[۶]

[۱]کارشناس ارشد سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه جندی شاپور، اهواز، ایران.

[۲]استاد سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه جندی شاپور، اهواز، ایران.

[۳]مربی سم‌شناسی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[۴]دانشیار ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه جندی شاپور، اهواز، ایران.

[۵]استادیار ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

[۶]استادیار سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه جندی شاپور، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آسیب‌های اکسیداتیو مزمن به‌عنوان عامل ایجاد بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی، دیابت و آلزایمر شناخته شده‌اند. آنزیمی که در تعدادی از این فرآیندها اثر مهمی دارد، سیکلواکسیژناز- ۲ (COX-2) می‌باشد. این آنزیم نقش مهمی در توسعه و پیشرفت تومور دارد. مهارکننده‌های COX-2 برای اعمال اثرات ضدتوموری خود باید با دوز بالا و به مدت طولانی مصرف شوند که عوارض جانبی مهمی از جمله عوارض قلبی-عروقی را در پی دارند. سلکاکسیب از رشد تومور کولورکتال جلوگیری کرده، و مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی را در مدل‌های In Vitro, In Vivo القا می‌نماید. در مدل‌های انسانی و حیوانی سرطان کولورکتال، اختلال در تنظیم بیان سیکلواکسیژناز- ۲ دیده شده است. در این بین توجه به ظرفیت عوامل آنتی‌اکسیدان مانند ویتامین E، به‌ویژه فرم آلفای آن برای از بین بردن آسیب رادیکالی آزاد، القای آپوپتوز و تحریک بیان انکوژن‌ها، این ویتامین را به گزینه‌ای مناسب جهت شیمی‌درمانی تبدیل کرده است. مطالعات نشان داده است که ویتامین E سرطان‌زایی و آسیب DNA ناشی از UV را در حیوانات آزمایشگاهی مهار می‌کند. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر سلکاکسیب و آلفاتوکوفرول در القای مرگ سلولی در رده‌ی سلول سرطان کولون انسانی صورت گرفت.

روش بررسی: در این تحقیق سلول‌های سرطانی کولورکتال (HT29) به‌وسیله‌ی سلکاکسیب و آلفاتوکوفرول تحت تیمار قرار گرفتند و با تکنیک DNA فراگمانتاسیون جهت تعیین مرگ سلولی بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد سلکاکسیب به‌تنهایی در ۲ غلظت پایین (۲۵، ۵۰ میکرومولار) نمی‌تواند مرگ سلولی را القا نماید، ولی در غلظت‌های بالاتر(۷۵، ۱۰۰ میکرومولار) مرگ سلولی القا می‌شود.

نتیجه‌گیری: تجویز ویتامین E به همراه سلکاکسیب موجب القای مرگ سلولی در همه‌ی غلظت‌های آن می‌گردد. نتایج این تحقیق نشان داد که برای ایجاد مرگ سلولی و احتمالاً اثرات درمانی می‌توان از دوزهای پایین سلکاکسیب، به همراه ویتامین E استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: سلکاکسیب؛ توکوفرول؛ مرگ سلولی؛ سرطان کولون.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه جندی شاپور، اهواز، ایران؛

تلفن: ۰۹۱۷۷۷۱۷۹۹۰ آدرس پست الکترونیکی: rezaei.mohsen@Gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۲۴

مقدمه

آلفاتوکوفرول [شکل عمده‌ی ویتامین E (C29H50O2) در طبیعت]، مشتقی ازحلقه‌ی کرومان (Chromane) است. این حلقه از اتصال یک حلقه‌ی بنزنی و حلقه‌ی پیران حاصل می‌شود (۱). بر اساس اطلاعات پاراکلینیکی، ویتامین E ممکن است یک پاسخ ایمنی آنتی‌تومور، به‌وسیله‌ی القای شیمیوتاکسی‌های ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها، به محل تومور ایجاد نماید (۲). پاسخ آنتی‌توموری ویتامین E ممکن است در نتیجه‌ی فعال‌کردن فاکتورهای آنتی‌تومور شامل فاکتورهای نکروزکننده‌ی تومور آلفا و بتا (TNF-α, TNF-β) و P53 باشد (۳). همچنین ویتامین E و مشتقات آن اثرات قوی آپوپتیک را در چندین رده‌ی سلول سرطانی انسانی نشان داده است، و در بعضی موارد اثر عوامل شیمی‌درمانی را در مدل‌های حیوانی افزایش داده‌اند، به‌علاوه جهت افزایش مسیرهای آپوپتیک، ویتامین E می‌تواند چندین فاکتور تومور مانند پروتئین کیناز C (PKC) را مهار کند (۲). پروتئین کیناز C یک فاکتور آنتی‌آپوپتیک است که در چندین نوع تومور بیان می‌شود. ویتامین E به‌خصوص آلفاتوکوفرول سوکسینات (α-TS) به‌طور شگفت‌آوری در سرطان پروستات و سینه اثر ضد توموری دارد؛ در حالی‌که نمی‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های نرمال اپی‌تلیال القا نماید. القای آپوپتوز در سلول‌های تومور یک روش مؤثر در تنظیم رشد تومور می‌باشد و از مسیرهای مختلف انجام می‌شود (۵،۴). مطالعه‌ی RAo و همکاران در سال ۲۰۰۲، منجر به شناخت القای آپوپتوز در رده‌های سلولی مختلف توسط HMG-CoA ردوکتاز و مهارکننده‌های COX-2 در غلظت‌های بالا شد. در این بررسی جهت ایجاد آپوپتوز دوز بالای مهارکننده‌ی COX-2 به کار برده شده است که در کلینیک آسیب‌رسان خواهد بود (۵). Jiang و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳، مقایسه‌ای میان آلفاتوکوفرول و گاماتوکوفرول انجام دادند، و به این نتیجه دست یافتند که اثرات مفید گاماتوکوفرول مربوط به مهار COX-2 است. در این مطالعه مشخص گردید که آلفاتوکوفرول علاوه بر چنین فعالیتی دارای اثرات ضدالتهابی هم می‌باشد (۶). سیکلواکسیژناز- ۲ نقش مهمی در توسعه و پیشرفت تومور از طریق گیرنده‌ی اندروژن، سیکلین D1 و دیگر فاکتورهای ناشناخته دارد؛ به‌طوری‌که مهار این آنزیم به‌صورت اثرات ضدسرطانی مشاهده می‌گردد. همچنین مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده که استفاده منظم از مهارکننده‌های COX-2 باعث پیشگیری سرطان در انسان می‌شود (۴). گزارشات نشان داده‌اند که بیان بالای سیکلواکسیژناز- ۲ منجر به مهار آپوپتوز شده و نیز سیکل کینیتیکی سلول‌های اپی‌تلیال سیستم گوارشی را تغییر می‌دهد (۸،۷). مطالعه بر روی حیوانات بیانگر این مطلب است که رشد مؤثر تومور نیازمند وجود ژن COX-2 در میزبان می‌باشد، و افزایش بیان ژن COX-2 برای القای تومور سینه در میزبان کافی است، و همچنین مغلوب‌کردن ژن COX-2 در موش می‌تواند تومورزایی را سرکوب نماید (۱۰،۹). COX-2 با کاتالیز سنتز PGE2 می‌تواند در التهاب و بعضی بیماری‌ها مانند سرطان و بیماری‌های قلبی- عروقی نقش داشته باشد (۱۱). مشکلات کاربرد Coxibها (عوامل مهارکننده‌ی سیکلو اکسیژناز ۲)، که در اثر کاهش تولید مواد آنتی‌ترومبولیتیک و پروستاسیکلین باعث عوارض قلبی- عروقی می‌شوند، به‌ناچار منجر به استفاده از دوزهای بالای آنها در زمینه‌ی درمان و پیشگیری سرطان و سمی‌شدن غیرقابل پیش‌بینی این داروها می‌گردد (۱۱). این مسئله جستجو برای یافتن جایگزین کم‌خطر برای آنها را اجتناب‌ناپذیر می‌نماید. دوره‌ی طولانی مصرف این داروها (بیش از ۶ ماه) به‌منظور درمان یا پیشگیری سرطان اهمیت بیشتری را برای استفاده از جایگزین مناسب در این زمینه روشن می‌سازد، بنابراین با توجه به خواص ذکر شده برای ویتامین E (آلفاتوکوفرول) و در نظر گرفتن نقش COX-2 در مهار آپوپتوز منطقی به‌نظر می‌رسد؛ تا اثر آپوپتوژنیک آنها بیشتر بررسی گردد (۱۱،۵). آپوپتوز در طول تکامل ارگانیسم‌های چند سلولی و ادامه‌ی حیات آنها اتفاق می‌افتد به عبارتی تلفیق آپوپتوز و تکثیر سلولی باعث شکل‌گیری بافت‌ها و اندام‌زایی می‌شود (۷). بعضی از بیماری‌ها مانند سرطان با اختلال در تنظیم آپوپتوز به‌وجود می‌آیند، در حالت طبیعی سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌شوند، ولی در سلول‌های سرطانی موتاسیون‌ها از آپوپتوز سلول‌ها جلوگیری کرده، و عدم مهار تکثیر سلول‌ها بیماری را به سمت تشکیل تومور پیش می‌برد (۷). نتایج نشان داده است عواملی را که با روش‌های مختلف آپوپتوز القا می‌کنند، در صورت استفاده به شکل ترکیبی، القای آپوپتوز را به‌صورت سینرژیستیکی با افزایش فعالیت کاسپاز-۳ افزایش می‌دهند (۱۳،۱۲). لذا در این مطالعه اثر سلکاکسیب که در درمان سرطان کولون به کار می‌رود، همراه با آلفا توکوفرول در القای آپوپتوز رده‌ی سلول سرطان کولون

انسانی (HT 29) به روش استخراج فنلی قطعات DNA به‌وسیله‌ی آگارز الکتروفورز بررسی شده است.

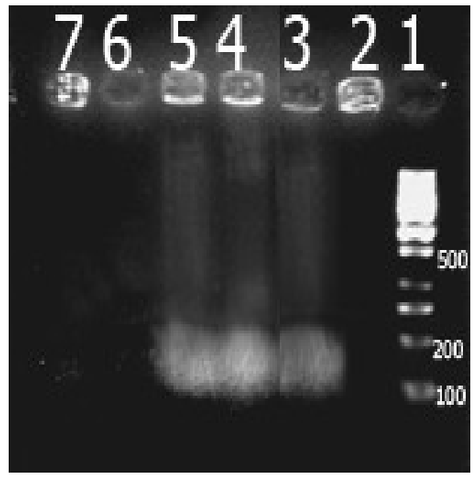
روش بررسی

رده‌ی سلول سرطانی کولورکتال انسانی (HT29) از مؤسسه‌ی انستیتو پاستور تهران خریداری گردید، سلول‌های HT29 به مدت ۱۰ روز مورد پاساژ قرار گرفتند، در طول این مدت مرتباً به‌وسیله‌ی میکروسکوپ فاز معکوس بررسی شدند. از آنجایی که با استناد به مقالات، تعداد ۱۰۶ سلول تحت تیمار با غلظت‌های مختلف دارو لازم بود، بنابراین پس از شمارش سلولی تعداد سلول‌ها را در هر میلی‌لیتر از محیط کشت به ۱۰۶ سلول رسانیده و به هر خانه از پلیت‌های۶ Well در زیر هود و محیط استریل منتقل شدند. زمان لازم برای تأثیر داروها بر روی سلول‌های HT29 بر اساس مقالات، ۱۴ ساعت و انیزومایسین به‌عنوان کنترل مثبت ۲ ساعت بیان گردید. تیمار با انیزومایسین در این مدت زمان به‌خوبی آپوپتوز را القا می‌کند. بعد از اتمام زمان دارودهی جهت بررسی توان‌زیستی، شمارش سلول‌های HT29 با تریپان بلو انجام شد. سپس سلول‌های مورد مطالعه برای ارزیابی میزان آپوپتوز القا شده به‌وسیله‌ی داروها، با تکنیک DNA فراگمنتاسیون بررسی شدند. در مرحله‌ی استخراج فنلی قطعات DNA به‌وسیله‌ی آگارز الکتروفورز، جهت لیز شدن غشای سلول‌ها و جدا شدن آنها از سطح پلیت‌ها به هر Well، ۵/. میکرولیتر PBS و ۵۵ میکرولیتر Lysis Buffer اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس محلول حاصل به میکروتیوب منتقل شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور g 12000 سانتریفوژ گردید، محلول رویی به میکروتیوب‌های جدید منتقل، و ۵۵۵ میکرولیتر فنل کلروفرم به آنها افزوده و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول حاصل را به لوله‌ی فالکون انتقال داده، و سپس ۱۱۰۰ میکرولیتر اتانول و ۵۵ میکرولیتر آمونیوم استات به آن اضافه گردید، پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب حاصل ۳۰ میکرولیتر RNase و ۳۰ میکرولیتر بافر TE افزوده شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از ورتکس برای مرحله‌ی الکتروفورز هموژن شدند. در ادامه مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه‌ها با ۲ میکرولیتر از Loading بافر(بافر بارگیری) مخلوط گردید، و در چاهک‌های مخصوص ژل آگارز (۱/۲٪) 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 ۱ میکرولیتر مارکر در درون چاهک مخصوص خود، برای بررسی قطعات آپوپتوتیک گذاشته شد. در ادامه تانک مخصوص الکتروفورز به دستگاه Power Supply ابتدا با ولتاژ ۵ ولت به مدت ۵ دقیقه و سپس ۱۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه متصل گردید. بعد از مشاهده‌ی حالت اسمیر مورد نظر با استفاده از دستگاه Gel Documentation عکس‌برداری صورت گرفت. توان‌زیستی سلول‌ها از فرمول (۱۰۰ ×تعداد کل سلول‌ها/تعداد سلول‌های زنده= توان‌زیستی سلول‌ها) محاسبه شد.

یافته‌ها

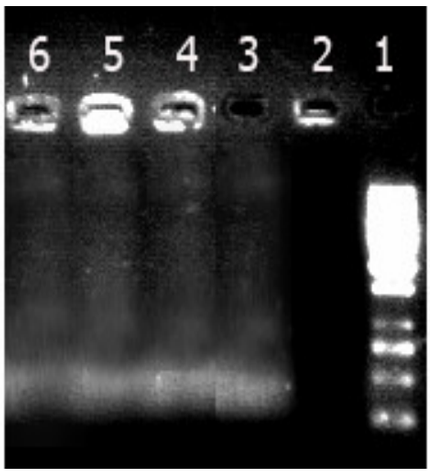
تعداد سلول‌های زنده در هر میلی‌لیتر برابر ۸۶۸۰۰۰، تعداد سلول‌های مرده در هر میلی‌لیتر برابر ۷۲۰۰۰، تعداد کل سلول‌ها در هر میلی‌لیتر برابر ۹۴۰۰۰۰ عدد بود. بنابراین توان‌زیستی سلول‌ها برابر با ۹۲/۳٪ محاسبه گردید.

نتایج حاصل از ژل الکتروفورز برای تشخیص DNA فراگمانتاسیون: سلول‌های تیمار شده با آلفاتوکوفرول و سلکاکسیب به‌وسیله‌ی تکنیک ژل الکتروفورز برای تشخیص DNA فراگمانتاسیون و القای آپوپتوز بررسی شدند. در این روش فراگمنت‌های DNA ناشی از آپوپتوز به دلیل وزن کمتر نسبت به ژنوم، تحت تأثیر اختلاف پتانسیل با سرعت بیشتری حرکت کردند. در مقایسه با مارکر bp1000 حدود باند bp200 این قطعات قرار گرفتند، در این ناحیه حالت اسمیر به‌صورت هاله‌ای مشاهده شد. البته شدت نور نمی‌تواند مقدار القای آپوپتوز را نشان دهد. اساس نتیجه‌گیری در این روش مقایسه‌ی نمونه‌های مختلف با کنترل منفی می‌باشد. اگر نمونه مانند کنترل منفی باشد آپوپتوز القا نشده، در غیراین صورت آپوپتوز القا شده است. بر اساس مقایسه‌ی نتایج شکل شماره‌ی ۱ در تجویز سلکاکسیب به‌تنهایی فقط در غلظت‌های (۵۰، ۲۵ میکرومولار) آپوپتوز القا نشده است؛ در حالی‌که در تمام غلظت‌های ترکیبی آلفاتوکوفرول و سلکاکسیب بر اساس شکل‌های (۴-۲) و آلفاتوکوفرول به‌تنهایی بر اساس شکل شماره‌ی ۵ آپوپتوز القا صورت گرفته است.



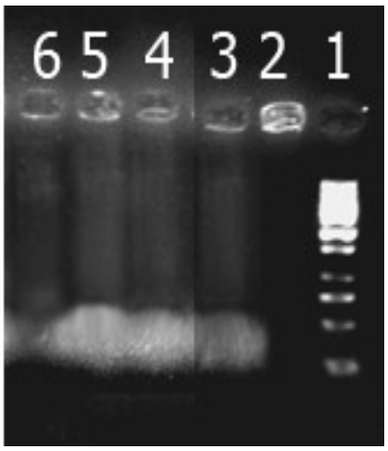
شکل شماره‌ی ۱: نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت ۱۰۶ سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف داروها، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید. (هر غلظت ۳ بار تکرار شده است)

۱- مارکر 1000 bp
۲- کنترل منفی
۳- کنترل مثبت
٤- Cel (celecoxib) 100µM
٥- Cel 75µM
٦- Cel 50µM
۷- Cel 25µM



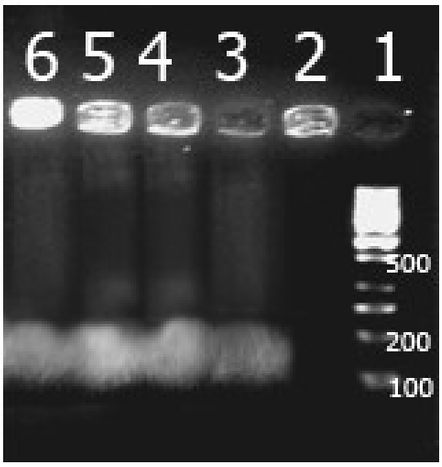
شکل شماره‌ی ۳: نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف داروها، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید. (هر غلظت ۳ بار تکرار شده است)

۱- مارکر 1000 bp
۲- کنترل منفی
۳- کنترل مثبت
٤- α T 20µM+Cel 50µM
٥- α T 10µM+Cel 50µM
٦- αT 5µM+Cel 50µM



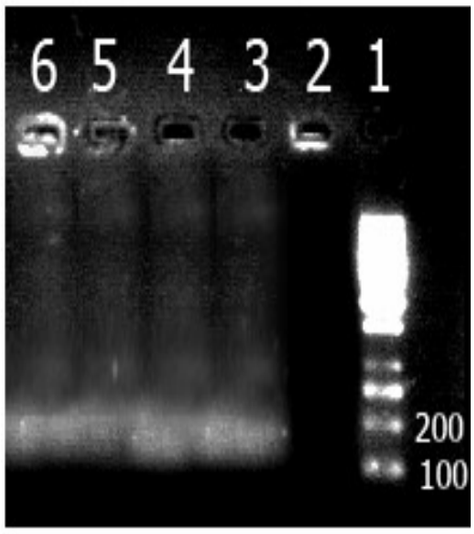
شکل شماره‌ی ۲: نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف داروها، مورد استخراج DNA قرارگرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید. (هر غلظت ۳ بار تکرار شده است)

۱- مارکر 1000 bp
۲- کنترل منفی
۳- کنترل مثبت
٤- αT (alpha tocopherol) 20µM+Cel 25µM
٥- α T 10µM+Cel 25µM
٦- αT 5µM+Cel 25µM



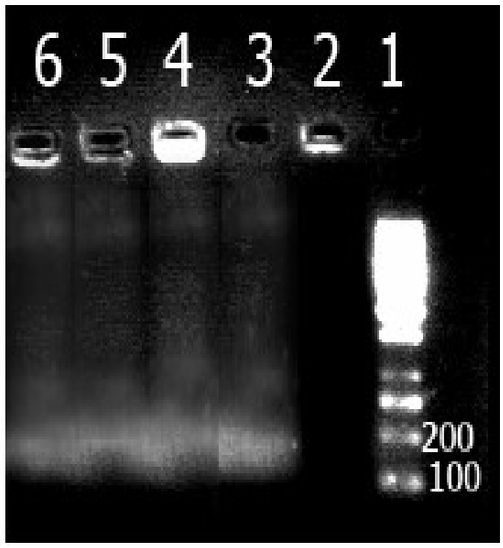
شکل شماره‌ی ٤: نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف داروها، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید. (هر غلظت ۳ بار تکرار شده است)

۱- مارکر 1000 bp
۲- کنترل منفی
۳- کنترل مثبت
٤- αT 5µM+Cel 75µM
٥- α T 10µM+Cel 75µM
٦- αT 20µM+Cel 75µM



شکل شماره‌ی ۵: نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف داروها، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید. (هر غلظت ۳ بار تکرار شده است)

۱- مارکر 1000 bp ۴- αT 20μM
۲- کنترل منفی ۵- α T 10μM
۳- کنترل مثبت ۶- αT 5μM



شکل شماره‌ی۶: نتایج حاصل از ژل الکتروفورز. سلول‌های HT29 در غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شدند که پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف داروها، مورد استخراج DNA قرار گرفته و ژنوم آنها با ژل الکتروفورز بررسی گردید. (هر غلظت ۳ بار تکرار شده است)

۱- مارکر 1000 bp ۴- αT 20μM+Cel 100μM
۲- کنترل منفی ۵- αT 10 μM+Cel 100μM
۳- کنترل مثبت ۶- αT 20 μM+Cel 100μM

بحث

در بررسی آپوپتوز از تکنیک‌های مختلفی مانند اندازه‌گیری توان‌زیستی سلول‌ها با MTT Assay، اندازه‌گیری آپوپتوز به‌وسیله‌ی انکزین V و یدید پروپیدیوم، با استفاده از DNA فراگمنتاسیون و فلوسیتومتری، آزمایش TUNEL جهت تشخیص DNA فراگمنتاسیون، اندازه‌گیری مرگ سلولی به‌وسیله‌ی تریپان بلو و استخراج فنلی قطعات DNA به‌وسیله‌ی آگارز الکتروفورز استفاده می‌شود. روش استخراج فنلی قطعات DNA به‌وسیله‌ی آگارز الکتروفورز، شکل اصلاح شده‌ی روش کلاسیک است که در سال ۱۹۸۰ به‌وسیله‌ی Wyllie به کار گرفته شد. محصولات حاصل از این روش خیلی خالص و قطعات DNA عاری از پروتئین می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر با توجه به امکانات موجود از روش مشاهده‌ی فراگمانتاسیون DNA جهت تشخیص آپوپتوز استفاده گردید. جهت تعیین توان‌زیستی سلول‌ها نیز تست تریپان بلو به کار برده شد. نفوذ تریپان بلو به داخل غشاهای سالم اساس این آزمایش می‌باشد. سلول‌های زنده و سلول‌هایی که در مراحل اولیه‌ی آپوپتوز هستند از غشای سالم برخوردار بوده و در زیر میکروسکوپ بی‌رنگ مشاهده می‌گردند. در حالی‌که سلول‌های نکروتیک و سلول‌هایی که در مراحل پایانی آپوپتوز می‌باشند در اثر نفوذ رنگ، آبی دیده می‌شوند (۱۳). ظرفیت عواملی مانند ویتامین E، به‌ویژه آلفا توکوفرول برای از بین بردن آسیب رادیکالی آزاد، القای آپوپتوز و تحریک بیان انکوژن‌ها، این ویتامین را گزینه‌ای مناسب برای شیمی‌درمانی معرفی می‌کند. مطالعات نشان داده است که ویتامین E سرطان‌زایی و آسیب DNA ناشی از UV را در حیوانات آزمایشگاهی مهار می‌کند (۱۴،۱۳). بر اساس اطلاعات پاراکلینیکی، ویتامین E ممکن است یک پاسخ ایمنی آنتی‌تومور، به‌وسیله‌ی القای شیمیوتاکسی ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها، در محل تومور ایجاد نماید (۱۵). پاسخ آنتی‌توموری ویتامین E ممکن است در نتیجه‌ی فعال کردن فاکتورهای آنتی‌تومور شامل فاکتورهای نکروزکننده‌ی تومور(TNF-α, TNF-β) و P53 باشد (۱۶). همچنین ویتامین E و مشتقات آن در چندین رده‌ی سلول سرطانی انسانی اثرات قوی آپوپتوتیک دارند و در بعضی موارد اثر عوامل شیمی‌درمانی را در مدل‌های حیوانی افزایش داده‌اند (۱۷،۳). به‌علاوه جهت افزایش مسیرهای آپوپتوتیک، ویتامین E می‌تواند چندین فاکتور تومور مانند پروتئین کیناز C (PKC) را مهار کند. پروتئین کیناز C یک فاکتور آنتی‌آپوپتیک است که در چندین نوع

تومور بیان می‌شود. ویتامین E به‌خصوص آلفاتوکوفرول سوکسینات (α-TS) به‌طور شگفت‌آوری در سرطان پروستات و سینه اثر ضدتوموری دارد؛ در حالی که آپوپتوز را در سلول‌های نرمال اپی‌تلیال القا نمی‌کند (۱۸). در مطالعه‌ی حاضر همان‌گونه که نتایج جدول شماره‌ی ۱ نشان می‌دهد، آلفاتوکوفرول در همه‌ی غلظت‌ها، آپوپتوز را در سلول‌های HT 29 القا کرده است. این غلظت‌ها بر اساس مرور مقالات انتخاب شدند، با این وجود بالاترین غلظت مورد استفاده (۲۰ میکرومولار) بسیار کمتر از مقداری است که در اثر مصرف ویتامین E (400IU روزانه) در پلاسما یا بافت‌ها یافت می‌شود. بررسی نشان داده است که با مصرف ویتامین E در دوز 400IU به شکل روزانه سطح سرمی و بافتی ویتامین E به‌صورت زیر خواهد بود (۱۹).

$C_p/R=C_t$ معمولاً در مورد داروهای محلول در چربی R=10 است. بعد از مصرف ویتامین E در دوز 400IU CP=25-30μM 10=Ct/25-30 Ct=250-300μM

جدول شماره‌ی ۱: وجود و یا عدم وجود مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در غلظت‌های مختلف آلفاتوکوفرول و سلکاکسیب و کاربرد هم‌زمان آنها

آلفا توکوفرول / سلکاکسیب	۰ میکرو مولار	۵ میکرو مولار	۱۰ میکرو مولار	۲۰ میکرو مولار
۰ میکرو مولار	−	+	+	+
۲۵ میکرو مولار	−	+	+	+
۵۰ میکرو مولار	−	+	+	+
۷۵ میکرو مولار	+	+	+	+
۱۰۰ میکرو مولار	+	+	+	+

با وجود اینکه غلظت‌های مورد استفاده کمتر از غلظت‌های In Vivo بودند؛ ولی به‌خوبی توانستند القاکننده‌ی مرگ سلولی باشند. این موضوع را می‌توان از چند جنبه بررسی نمود. ویتامین E نفوذپذیری غشایی بیشتری در سلول‌های سرطانی دارد که این مسئله می‌تواند در مورد سلول‌های HT 29 نیز صادق باشد. نتایج مطالعه‌ی Shklar در سال ۱۹۹۸ نیز تأییدی بر این یافته است (۲۰). همچنین در بررسی‌های In Vitro و محیط کشت سلولی اثر دارو با بدن متفاوت می‌باشد. در In Vitro فاکتورهای مؤثر بر رشد سلولی حاصل از ترشح سلول‌های دیگر، کمتر است. هرچند ویتامین E با اثر شیمیوتاکسی خود در مراحل اولیه می‌تواند مرگ سلولی را در سلول‌های نئوپلاسمیک القا نماید؛ با این وجود به دلیل سیر مزمن سرطان و التهاب خفیف و مزمنی که به این ترتیب ایجاد می‌شود، اثر ویتامین E در In Vivo کمتر خواهد شد (۲۲،۲۱). از طرف دیگر با توجه به بررسی‌های Salganik و همکارانش در سال ۲۰۰۲ مصرف ویتامین E در افراد سیگاری پتانسیل ابتلا به سرطان ریه را افزایش می‌دهد. در افرادی که سیگاری هستند مواد کاسینوژن حاصل از سیگار به‌وسیله‌ی ویتامین E قابل حذف نمی‌باشند. با این وجود ویتامین E در این افراد، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را جمع‌آوری می‌کند. به دلیل حضور کارسینوژن‌ها در این افراد سلول‌ها دچار آسیب شده و ROS بالا می‌رود که خود عاملی برای ایجاد مرگ سلولی است (۱۲). در این حالت اثر جاروکنندگی ویتامین E مانع اثر ROS در القای مرگ سلولی می‌شود. آنچه در مطالعه‌ی حاضر به دست آمد نشان‌دهنده‌ی اثرات القای مرگ سلولی به‌وسیله‌ی آلفاتوکوفرول و سلکاکسیب در غلظت‌های بسیار پایین می‌باشد.

نتیجه‌گیری

تجویز ویتامین E به همراه سلکاکسیب موجب القای مرگ سلولی در همه‌ی غلظت‌های آن می‌گردد. با توجه به نتایج این تحقیق، برای ایجاد مرگ سلولی و تعقیب اثرات درمانی می‌توان در دوزهای پایین سلکاکسیب، از ویتامین E استفاده نمود. قطعاً بررسی‌های تکمیلی در این خصوص گامی مؤثر در پیشبرد کنترل پروسه سرطان و کاهش پیچیدگی‌های ناشی از آن خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی مصوب کارشناسی ارشد دوره سم‌شناسی دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه جندی شاپور اهواز می‌باشد. بدین وسیله از زحمات فراوان معاونت محترم پژوهشی دانشگاه به دلیل تأمین منابع مالی این طرح، اساتید بزرگوار و فرزانه‌ی گروه توکسیکولوژی و فارماکولوژی دانشکده‌ی داروسازی به دلیل حمایت‌های دلسوزانه ایشان، پرسنل محترم آموزشی و پژوهشی دانشکده‌ی داروسازی و سرکار خانم‌ها دهباش و داغری به دلیل همکاری صمیمانه خود کمال سپاسگزاری را می‌نماییم.

References:

1. Shahbazi P, Maleknia N, et al. General Biochemistry for Students of Medical Sciences. Tehran: Tehran University Press; 2004. p. 79-83.(Vol2). [Text in Persian]

2. Tucke JM, Townsend DM. Alpha-Tocopherol: Roles in Prevention and Therapy of Human Disease. J Biomedicine & Pharmacotherapy 2005;59:380-387.

3. Schwartz JL, Antoniades DZ, Zhao S. Molecular and Biochemical lreprogramming of Oncogenesis Through the Activity of Prooxidantsand Antioxidants. Ann NY Acad Sci 1993;686:262-78 (discussion278–9).

4. Israel K, Yu W, Sanders BG, Kline K. Vitamin E Succinate Inducesapoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Role for Fas in Vitamin E Succinate-Triggered Apoptosis. Nutr Cancer 2000;36:90-100.

5. Swamy MV, Cooma I, Reddy BS, Rao CV, 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 Regimes. Int J Oncol 2002;20:753-759.

6. Jiang Q, Schwab IE, Courtemanche CH, Ames BN. γ-Tocopherol and Its Major Metabolite, in Contrast to α-Tocopherol, Inhibit Cyclooxygenase Activity in Macrophage and Epithelial Cells. PNAS 2000;97:11494-11499.

7. Tsujii M, Dubois RN. Alterations in Cellular Adhesion and Apoptosis in Epithelial Cells Overexpressing Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2. Cell 1995;83:493-501.

8. Dubois RA, Shao J, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD. GI Delay in Cells Overexpressing Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2. Cancer Res 1996;56:733-7.

9. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of Intestinal Polyposis in Apc Delta 716 Knockout Mice by Inhibition by Cyclooxygenase-2 (Cox-2). Cell 1996;87:803-9.

10. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey S, Dubios RN. Host Cyclooxygenase-2 Modulates Carcinoma Growth. J Clin Invest 2000;105:1589-94.

11. Jeffery M, Drazen MD. Cox-2 Inhibitors A Lesson in Unexpected Problems. ENGL MED 2005;325:11.

12. Salganik RI. The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanism in Cancer Patientsw and the Human Population. Journal of American College of Nutrition 2001;5:464s-472s.

13. Bonifacino JS, Dasso M, Harford JB, Lippincottschwartz J, Yamada KM. Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria. Current Protocols in Cell Biology 2001.

14. Shklar G, Schwartz J, Trickler DP, Niukian K. Regression by Vitamin E of Experimental Oral Cancer. J Natl Cancer Inst 1987;78:987-92.

15. Woutersen RA, Appel MJ, Van Garderenhoetmer A. Modulation of Pancreatic Carcinogenesis by Antioxidants. Food Chem Toxicol 1999;37:981-4.

16. Shklar G, Schwartz J. Tumor Necrosis Factor in Experimental Cancerregression with Alphatocopherol, Beta-Carotene, Canthaxanthin Andalgae extract. Eur J Cancer Clin Oncol 1988;24:839-50.

17. Turley JM, Funakoshi S, Ruscetti FW, Kasper J, Murphy WJ, Longo DL, et al. Growth Inhibition and Apoptosis of RL Human B Lymphoma Cells by Vitamin E Succinate and Retinoic Acid: Role for Transforming Growth Factor Beta. Cell Growth Differ 1995;6:655–63.

18. Kline K, Yu W, Sanders BG. Vitamin E and Breast Cancer. J Nutr 2004;134:3458S-3462S.

19. Dimitrov NV, Millan JM, Gilliand DG, Malone W. Plasma α-Tocopherol Concentrations after Supplementation with Water-and Fat-Soluble Vitamine E. Am J Clin Nutr 1996;64:329-35.

20. Shklar G. Mechanisms of Cancer Inhibition by Anti-Oxidant Nutrients. Oral Oncology1998;34:24-29.

21. Christen S, Hagen TM, Shigenaga MK, Ames BN. In Microbes, and Malignancy: Infection as a Cause of Human Cancers. Parsonnet J 1999;(44):35–88.

22. Ames BN, Shigenaga MK. Hagen TM. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90(17):7915-22.