Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 32, No. 1, Spring 2022 **ORIGINAL ARTICLE**

Effects of GW9508 small molecule on oxidative stress enzymes in colorectal cancer and non-cancerous HUVEC cells

Behnoosh Rafienia[1], Elham Hoveizi[2], Ali Shahriari[3]
[1] Student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Abstract

Background: In this study, we aimed to evaluate the effects of GW9508 as an unsaturated fatty acid on inducing oxidative stress in HT-29 cancer cell line and non-cancer HUVEC cells.
Materials and methods: The effects of GW9508 on cell viability were determined by performing MTT assay after 1, 3 and 5 days. The anti-oxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase enzymes' assay was performed to evaluate the apoptosis. Moreover, inverted microscope and DAPI staining were applied to measure the changes in cell and nucleus morphology.
Results: The *IC50* dose of GW9508 was 500 µM in both cancer and normal cells. Results of enzymatic activity assay exhibited the increscent of activity of catalase and SOD in treated cells led to promoting apoptosis in cells. The amount of activities of SOD and catalase in HT-29 treated cells that were calculated 1.254 and 0.338 mU/mg respectively, which had a significant increase compared to activities of these two enzymes in control cells (0.85 and 0.206 mU/mg, respectively) ($p \leq 0.05$). There was also a significant increase in the activities of SOD and catalase in HUVEC treated cells (1.111 and 0.517 mU/mg) compared to the activities of the two enzymes in the control group, which were calculated 0.755 and 0.184 mU/mg, respectively.
Conclusion: GW9508 small molecule induces oxidative stress and ROS production in HT-29 and HUVEC cells, leading to cytotoxicity and thus promoting apoptotic cell death in cancer cells. However, these effects are contingent upon dose and the type of cell lineages.
Keywords: *Colorectal cancer, Unsaturated fatty acid, Small molecule, Oxidative stress.*

Cited as: Rafienia B, Huveizi E, Shahriari A. Effects of GW9508 Small Molecule on Oxidative Stress Enzymes in Colorectal Cancer and Non-cancerous HUVEC Cells. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(1): **31-43.**

Correspondence to: Elham Hoveizi
Tel: *+98 6133331045*
E-mail: e.hoveizi@scu.ac.ir.com
ORCID ID: 0000-0002-3285-5682
Received: 14 May 2020; **Accepted:** 29 Dec 2021

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، صفحات ۳۱ تا ۴۳

Original Article

اثرات کوچک‌مولکول GW9508 بر آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی کولون و سلول‌های غیرسرطانی HUVEC

بهنوش رفیعی نیا[۱]، الهام حویزی[۲]، علی شهریاری[۳]

[۱] دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] دانشیار، گروه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات کوچک مولکول GW9508 به عنوان یک اسید چرب غیراشباع بر تولید استرس اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی HT-29 و سلول‌های غیرسرطانی HUVEC بود.*

روش بررسی: *اثرات GW9508 برتوان زیستی سلول‌ها در روزهای ۱، ۳ و ۵ پس از تیمار با روش MTT بررسی شد. از سنجش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز برای بررسی استرس اکسیداتیو استفاده شد. همچنین بررسی تغییرات سلول و هسته‌ها، با استفاده از میکروسکوپ اینورت و رنگ‌آمیزی دپی انجام شد.*

یافته‌ها: *غلظت GW9508 IC50 در هر دو رده سلول سرطانی و نرمال ۵۰۰ میکرومولار ارزیابی شد. نتایج سنجش فعالیت آنزیمی نشان داد که افزایش فعالیت کاتالاز و SOD در سلول‌های تیمار یافته سبب پیشبرد آپوپتوز در این سلول‌ها گردید. میزان فعالیت SOD و کاتالاز در سلول‌های HT-29 تیماریافته به ترتیب ۱/۲۵۴mU/mg و ۰/۳۳۸ ارزیابی شد که نسبت به فعالیت این دو آنزیم در گروه کنترل منفی سلول‌های سرطانی (۰/۸۵mU/mg و ۰/۲۰۶) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p\leq ۰/۰۵$). همچنین افزایش معنی‌دار فعالیت SOD و کاتالاز در سلول‌های تحت تیمار HUVEC (۱/۱۱۱mU/mg و ۰/۵۱۷) نسبت به فعالیت این دو آنزیم در گروه کنترل به ترتیب ۰/۷۵۵mU/mg و ۰/۱۸۴ محاسبه شد.*

نتیجه‌گیری: *کوچک مولکول GW9508 با القای استرس اکسیداتیو و تولید ROS در سلول‌های HT-29 و HUVEC، سبب سمیت و در نتیجه پیشبرد مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی می‌شود. با این حال این اثر وابسته به دوز و نوع رده سلولی است.*

واژگان کلیدی: *سرطان کولورکتال، اسید های چرب غیر اشباع، کوچک مولکول، استرس اکسیداتیو.*

مقدمه

از جمله شایع‌ترین سرطان‌ها، سرطان روده بزرگ (کولورکتال) است. نئوپلاسم‌های بدخیم با منشا کولون، رکتوم و کانال آنال تحت عنوان سرطان کولورکتال طبقه‌بندی می‌شوند. سرطان کولورکتال یکی از تهدیدکننده‌های جدی سلامت انسان محسوب می‌شود. این سرطان از نظر شیوع، پنجمین سرطان بدخیم درکشورهای توسعه‌یافته است. بر اساس گزارش‌های سالانه این بدخیمی به ترتیب، پنجمین و سومین سرطان شایع در مردان و زنان ایرانی است (۱).

در طی دهه‌های اخیر از روش‌های پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و جراحی برای مبارزه با سرطان استفاده شده است که هرکدام از این روش‌ها ضعف‌هایی را به همراه داشته است. عوارض جانبی نظیر نرسیدن دارو با غلظت مناسب به بافت هدف،

آدرس نویسنده مسئول: اهواز، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، الهام حویزی (**email**: e.hoveizi@scu.ac.ir.com)
ORCID ID: 0000-0002-3285-5682
تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۲/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۸

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

اثرات مخرب پرتودرمانی بر دیگر بافت‌های سالم و همچنین مقاوم شدن بدن در برابر درمان را میتوان نام برد (۴-۲). لذا ضرورت یافتن راهکارهای درمانی نوین، موثر و با کمترین عوارض جانبی احساس می‌شود.

در حال حاضر مرگ سلولی آپوپتوزی و اتوفاژی، پایه‌هایی برای هدف‌های درمانی جدیدند که سبب القای مرگ سلولی و افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی در مقابل داروهای شیمی‌درمانی و پرتودرمانی شده اند. لذا این دو فرآیند به شدت مورد مطالعه محققان حوزه سرطان قرار گرفته اند و امروزه بسیاری از داروهای تولید شده در زمینه سرطان سبب تنظیم مرگ سلولی می‌شوند (۲، ۳، ۵، ۶).

از سوی دیگر، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اسیدهای چرب غیراشباع نقش به سزایی در درمان سرطان دارند. این مولکول‌های زیستی فعال با اتصال به گیرنده‌های اسیدچرب آزاد که از نوع گیرنده جفت شده با Gپروتئین است به عنوان سیگنالینگ‌های خارج سلولی ایفای نقش کرده و عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی را اعمال می‌کنند که بسیاری از آن‌ها در درمان بیماری‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفته است (۷، ۸). گیرنده GPR40 رسپتوری برای اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره بلند از جمله لینولئیک اسید کانژوگه (CLA) است. رسپتورهای جفت شده با G پروتئین ها از جمله فراوان‌ترین رسپتورهای بدن محسوب می‌شوند که از لحاظ عملکرد فیزیولوژی بسیار متنوع هستند. رسپتور GPR40 به عنوان یک پروتئین عرض غشایی به اسیدهای چرب آزاد متصل شده و به عنوان یک سنسور حساس به مواد مغذی در تنظیم هومئوستازی انرژی فعالیت دارد. از جمله مسیرهای سیگنالینگ مربوط به این رسپتور می‌توان به فعالیت برخی کانال‌های یونی، فعالیت آنزیم فسفولیپاز C که سبب هیدرولیز فسفوتیدیل اینوزیتول دی فسفات شده و در نهایت سبب تنظیم یون کلسیم و فعالیت پروتئین کیناز C می‌گردد که در فرایندهای چندگانه و متنوعی در طی مراحل تکوینی از جمله تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مرگ سلولی دخیل است، و یا فعال شدن آنزیم آدنیلیل سیکلاز و تولید cAMP و فعالیت پروتئین کیناز A می شود که هر کدام می‌توانند در مسیرهای مختلف رشد و نموی موثر واقع شوند (۷، ۹). مطالعات زیادی مرتبط با تاثیر این لیگاندها، مسیرهای سیگنالینگ و نقش آنها در اعمال حیاتی سلول، هومئوستازی و آپوپتوز انجام شده است؛ از جمله مطالعات بسیاری، نقش ضدسرطانی CLA و دیگر اسیدهای چرب آزاد غیراشباع را تایید می‌کند. GW9508 کوچک مولکول و آگونیست گیرنده فوق است (۸، ۹). این کوچک مولکول از طریق ایجاد و افزایش استرس اکسیداتیو می‌تواند سبب پشبرد آپوپتوز و اتوفاژی در سلول شود و متعاقبا به عنوان هدف درمانی نوینی برای درمان سرطان باشد (۱۰). Fauser و همکارانش (۲۰۱۱) دریافتند که اسیدچرب غیراشباع با زنجیره طویل لینولئیک اسید کانژوگه در محیط in vitro فعالیت ضدتکثیری داشته که شامل القای استرس اکیسداتیو و تغییر در مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی است. همچنین بیان داشتند که بوتیرات که یک اسیدچرب با زنجیره کوتاه است و CLA به عنوان اسیدچرب با زنجیره طویل دارای خصوصیات آنتی‌نئوپلاستیک در سلول‌های کولورکتال بوده و این ماده در تیمار و شیمی درمانی برای سرطان کولون بواسطه القای توقف چرخه سلولی، تغییرات اپی‌ژنتیک، تغییر در چرخه ردوکس داخل سلولی، تغییر مسیرسیگنالینگ Wnt/β-catenin و همچنین استرس اکسیداتیو نقش کمک‌کننده داشته که همگی مرگ سلولی و آپوپتوز را به دنبال دارند (۴). همچنین مطالعه اثرات یکی از ایزومرهای CLA (Trans-10, cis-12 CLA) بر القای مرگ سلولی در سرطان کولون انسانی نشان داد که این ماده از طریق افزایش تولید ROS با منشا شبکه اندوپلاسمی سبب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون می‌شود (۱۱). مطالعات نشان داده‌اند که ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های هدف یکی از عوامل القای آپوپتوز و اتوفاژی است. ROS در سطوح پایین فیزیولوژیکی به عنوان سیگنالینگ ردوکس (اکسایش- کاهش) برای تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی مهم است. هرگونه اختلال در تعادل اکسیداسیون و آنتی‌اکسیداسیون ROS می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو شده که با طیف وسیعی از اختلالات در انسان مانند التهاب مزمن، بیماریهای مرتبط با افزایش سن و سرطان‌ها مرتبط است (۱۲). بعلاوه کنترل دقیق هومئوستاز ROS برای حفظ کارکرد طبیعی سلول‌های نرمال سرنوشت‌ساز است. ROS به شدت فعال است و می‌تواند با بسیاری از مولکول‌های داخل سلولی مانند اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها واکنش داشته باشند. سطوح بالای ROS ناشی از استرس اکسیداتیو، سبب برهم زدن تعادل ردوکس و آسیب‌های اکسیداتیو و متعاقبا مهار عملکرد صحیح پروتئین‌ها و تنظیم‌کننده‌های مسیرهای پیام‌رسانی در بیماری‌های نظیر سرطان می‌شوند (۱۳، ۱۴). برای مقابله با استرس اکسیداتیو به‌طور معمول سیستم آنتی‌اکسیدانی که شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و همچنین سیستم آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل اسیدآسکوربیک

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

(ویتامینC)، گلوتاتیون و غیره توسط بدن تولید می‌شود (۱۳). از سوی دیگر القای افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن سبب پیشبرد مرگ سلولی می‌شود و در درمان‌های غیرجراحی مانند پرتودرمانی و شیمی‌درمانی سبب افزایش حساسیت بافت توموری شده و به عنوان ماشه‌ای برای القا و آغاز مرگ سلولی محسوب می‌شود (۱۳، ۱۵). بنابراین می‌توان از این عامل در جهت از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده کرد.

با توجه به آنچه بیان شد هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات کوچک مولکول GW9508 به عنوان یک اسید چرب غیراشباع بر تولید ROS و افزایش فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی HT-29 و سلول های غیرسرطانی HUVEC بود.

مواد و روشها

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است که با کد EE.97.243.93365/scu.ac.ir در دانشگاه شهید چمران اهواز به ثبت رسیده است.

کوچک‌مولکول GW9508 (Sigma, USA) با مشخصات وزن مولکولی ۳۴۷/۴۱ و با فرمول شیمیایی $C_{22}H_{21}NO_3$ تهیه شد. همچنین رده سلولی سرطان کولون (HT-29 cell line) و رده سلولی اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسان (HUVEC cell line) از بانک انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) غنی شده با ۱٪ (v/v) پنی‌سیلین –استرپتومایسین (Gibco, USA) و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS, Gibco, USA) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO2 و ۹۵٪ رطوبت انکوبه شدند.

بررسی اثر سمیت و بقای سلولی

به منظور بررسی اثرات سمیت و کشندگی کوچک مولکول GW9508 بر روی رده‌های سلولی از روش رنگ‌سنجی MTT (Microculture Tetrazolium Test) (Sigma, USA) استفاده شد. سلول‌های رده سرطانی HT-29 و رده نرمال HUVEC به تعداد 10^4 در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و بعد از گذشت انکوباسیون ۲۴ساعته، سلول‌های سرطانی HT-29 و نرمال HUVEC با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کوچک‌مولکول GW9508 در فاصله زمانی ۲۴ساعت تیمار شدند. بعد از گذشت زمان فوق، ابتدا مورفولوژی سلول‌های تیمار یافته و گروه کنترل با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Labomed, USA) بررسی و عکسبرداری شد. سپس محتوی چاهک‌های پلیت ۹۶خانه به دقت خارج و حدود ۱۰۰ میلی لیتر محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در تاریکی به هر چاهک اضافه و به مدت ۴ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO2 و ۹۵٪ رطوبت انکوبه شد. سپس در تاریکی محلول MTT از چاهک‌ها خارج و کریستال‌های فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده، در DMSO (Merck, Germany) حل گردید و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه خوانش‌گر الایزا (BioTec, USA) جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان بقای سلولی توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{میزان بقای سلولی} = \frac{\text{جذب نوری نمونه کنترل بدون سلول} - \text{جذب نوری سلول‌های گروه تیمار شده}}{\text{جذب نوری نمونه کنترل بدون سلول} - \text{جذب نوری سلول‌های گروه کنترل منفی}} \times 100$$

رنگ آمیزی DAPI

به منظور رنگ‌آمیزی دپی سلول‌های HT-29 و HUVEC به میزان ۵۰ هزار سلول در هر چاهک پلیت ۲۴خانه کشت داده شدند و در انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها تحت تیمار غلظت IC50 کوچک مولکول GW9508 و گروه کنترل محیط حاوی سرم FBS ۱۰٪ را دریافت کردند. پس از ۲۴ ساعت از تیمار، سلول‌ها با پارافرمآلدهید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند و پس از شستوشو به مدت ۱ الی ۵ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر رنگ DAPI (Sigma, USA) با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر قرار داده شدند. در نهایت پس از شستوشو با PBS (Sigma, USA) با استفاده از فیلتر بنفش میکروسکوپ فلوئورسنس (Olympus, Japan) بررسی شدند.

سنجش آنزیمی

در این مطالعه جهت بررسی دخالت ROS و استرس اکسیداتیو در القای مرگ سلولی، میزان فعالیت آنزیم‌های کالاتاز و سوپراکسیددیسموتاز در هر دو رده‌ی سلولی در گروه‌های تیمار (با غلظت IC50 کوچک مولکول GW9508) و گروه کنترل اندازه‌گیری شد. برای این منظور سلول‌ها در پلیت ۶ خانه و در هر چاهک حاوی 3×10^5 سلول، کشت شدند و بعد از ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت IC50 دارو قرار گرفتند (گروه کنترل فقط محیط کامل دریافت کرد) و بعد از گذشت ۲۴ساعت، سلول‌ها با کمک تریپسین (Gibco, USA) از کف چاهک‌ها جدا و بعد از سانتریفوژ رسوب سلولی حاصل در PBS حل شد و مجددا سانتریفیوژ شد. در ادامه به رسوب سلولی لیزبافر ریپا اضافه شد و رسوب به صورت آسپیره در لیز بافر حل گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. بعد از آن محلول با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴- درجه

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ که حاوی عصاره آنزیمی بود با دقت برداشته و به میکروتیوب جدیدی منتقل شد. تمامی مراحل برای جلوگیری از دناتوره شدن و لیز شدن پروتئین‌ها، بر روی یخ انجام شد. در ابتدا با استفاده از روش برادفورد مقدار کل پروتئین موجود در نمونه محاسبه و سپس مقدار فعالیت آنزیمی آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز اندازه‌گیری شد.

سنجش مقدار کل پروتئین به روش برادفورد

روش برادفورد روشی سریع و حساس برای تعیین میزان پروتئین‌هاست. در این روش از کوماسی بلو استفاده می‌شود که با اسیدهای آمینه آروماتیک به‌خصوص آرژنین تشکیل کمپلکس می‌دهد و منجر به تغییر رنگ قهوه‌ای به آبی می‌شود که بیشترین جذب این ترکیب رنگی در طول موج ۵۹۵ نانومتر است. غلظت‌های مختلفی از پروتئین آلبومین سرم گاوی در محدوده ۰/۵-۰/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر جهت رسم نمودار استاندارد تهیه شد. جهت اندازه‌گیری به روش میکروپلیت، در هر چاهک پلیت ۹۶خانه، حجم معینی از نمونه ریخته شد و سپس معرف برادفورد به آن اضافه شد. برای گروه بلانک از آب مقطر و معرف برادفورد استفاده شد.

پس از گذشت ۱۰ دقیقه، میزان جذب(OD) نمونه‌های تیمار یافته، گروه کنترل منفی و بلانک در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه خوانش‌گر الایزا خوانده شد سپس با استفاده از منحنی استاندارد و معادله خط آن، غلظت پروتئین از روی منحنی استاندارد بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.

$y= 0.0009x + 0.8032$

($y= OD$, $x= \mu g/ml$ Protein)

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش دستی و با استفاده از روش Kono انجام شد (16). این روش به کمک سنجش مهار احیای نیترولوتترازولیوم (NBT) درحضور SOD در طوح موج ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. در این روش در اثر اکسیداسیون خود به خودی هیدروکسیل آمین، آنیون سوپراکسید تولید می‌شود که ترکیب NBT با سوپر اکسید واکنش داده و رنگ قرمز فورمازان را تولید می‌کند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجود در نمونه در واکنش با سوپراکسید و تبدیل آن به هیدورژن پراکسید از واکنش سوپراکسید با NBT و تشکیل رنگ قرمز جلوگیری می‌کند. جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، محلول‌های سدیم‌کربنات، NBT، هیدروکسیل آمین، تریتون و همچنین محول نمونه در میکروپلیت ریخته شدند وسپس میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر در لحظه اول (t=۰) و پس از گذشت ۵ دقیقه (t=۵) میزان جذب نوری یک‌بار دیگر قرائت شد. در نهایت فعالیت مهاری آنزیم (IU/L) و فعالیت آنزیمی SOD بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (mU/mg protein) با استفاده از فرمول‌های زیر و مقادیر قرائت شده حاصل شد.

$$\text{U/mg protein}=\frac{\text{ضریب رقت}\times(\text{IU})\text{درصد بازدارندگی}}{\text{میلی گرم پروتئین}\left(\frac{mg}{ml}protein\right)\times ۵۰}\ (\text{فعالیت آنزیم})$$

$$\text{Inhibition}=\frac{\Delta OD\ (blank)-\Delta OD\ (sample)}{\Delta OD\ (blank)}\times ۱۰۰\ (\text{درصد بازدارندگی})$$

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Koroluk و همکاران انجام گرفت (۱۷). اساس این آزمون بر میزان کاهش پراکسید هیدروژن در واحد زمان در اثر فعالیت آنزیم کاتالاز موجود در نمونه استوار است. مولیبدات آمونیوم با پراکسید هیدروژن مجموعه زردرنگی تشکیل می‌دهند. در این روش نمونه در مجاورت آب اکسیژنه قرار گرفت که آنزیم موجود در نمونه آب‌اکسیژنه را به آب و اکسیژن تبدیل کرد. آب‌اکسیژنه باقی مانده در نهایت با آمونیوم مولیبدات تولید رنگ کرده و شدت رنگ حاصله با میزان فعالیت آنزم رابطه معکوس دارد. یک واحد بین‌المللی مقدار آنزیمی است که در مدت یک دقیقه یک میکرومول پراکسیدهیدروژن را تجزیه نماید. جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، معرف‌ها و نمونه حاوی عصاره آنزیمی در میکروپلیت ریخته شد و جذب نوری نمونه‌ها و بلانک در مقابل بافر تریس-HCl در طول موج ۴۱۰ نانومتر به وسیله دستگاه خوانش‌گر الایزا قرائت شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه‌ها به وسیله فرمول زیر محاسبه شد:

$$(\text{U/L})=\frac{OD\ (blank)-OD\ (sample)}{OD\ (blank)}\times 100$$

$$\text{mU/mg protein}=\frac{\text{ضریب رقت}\times U/L}{\text{میکرو گرم پروتئین}\left(\frac{\mu g}{ml}protein\right)}\ (\text{فعالیت آنزیم})$$

آنالیز داده‌ها

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری Graph Pad Prism، آزمون one-way ANOVA و T-test انجام شد. رسم نمودار در Excel 2016 انجام گرفت. P<۰/۰۵ برای نمونه‌ها به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

یافته‌ها

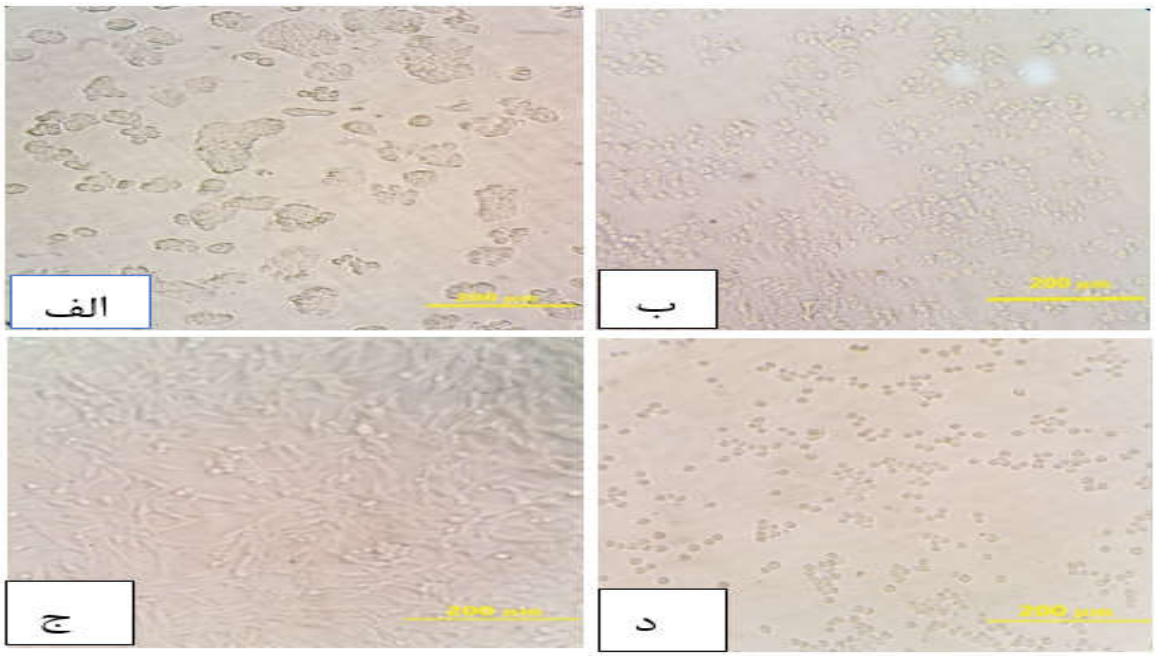
بررسی مورفولوژی

بررسی مورفولوژی سلول‌های HT-29 با استفاده از میکروسکوپ اینورت نشان داد که سلول‌های HT-29 گروه کنترل با ظاهری گرد با هسته‌های کروی در محیط کشت و به صورت فشرده کنار همدیگر قرار گرفته و ایجاد ساختارهای تک لایه به شکل کلنی‌های سلولی می‌کنند. اما سلول‌های HT-29 تحت تیمار با غلظت ۵۰۰ میکرومولار (*IC50*) کوچک مولکول، ازنظر ظاهری با سلول‌های گروه کنترل منفی تفاوت بارزی داشتند. بدین‌صورت که در سلول‌هایHT-29 تحت تیمار با GW9508 چروکیدگی و کاهش حجم سلول، متراکم شدن هسته، کاهش حجم سیتوپلاسم، از دست دادن کلنی‌های سلولی، عدم ارتباط و تعامل سلولی و ایجاد سلول‌های منفرد و پراکنده دیده شد که بیان‌گر این مسئله است که این غلظت دارای اثر سمیت بر سلول‌ها بوده و سبب پیشبرد مرگ سلولی می‌شود.

همچنین سلول‌های HUVEC گروه کنترل منفی با ظاهری کشیده و دوکی شکل با هسته‌های بیضوی و زایده‌های سیتوپلاسمی و در تعامل با سایر سلول‌ها دیده شدند. مورفولوژی سلول‌های HUVEC تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۵۰۰ میکرومولار (*IC50*) از کوچک مولکول، ازنظر ظاهری با سلول‌های گروه کنترل منفی تفاوت بارزی داشت. سلول‌های HUVEC تیمار یافته با GW9508 مورفولوژی طبیعی خود را از دست داده و از حالت دوکی و کشیده به‌صورت کروی دیده شدند. کاهش حجم سلول و چروکیدگی کاملا مشهود بود. همچنین متراکم شدن هسته، کاهش حجم سیتوپلاسم، از دست دادن ارتباط و تعامل سلولی و ایجاد سلول‌های منفرد و بدون زایده‌های سیتوپلاسمی گواهی بر این مسئله بود که این غلظت دارو، دارای اثر سمیت بوده و سبب پیشبرد مرگ سلولی شده است (شکل ۱).

نتایج تست MTT و بقای سلولی

میانگین جذب نوری به دست آمده از سلول‌های نرمال و سرطانی که تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار) GW9508 قرار گرفتند، با میانگین جذب نوری سلول‌های سرطانی و نرمال گروه کنترل مقایسه شد (مقادیر میانگین ۵ بار تکرار بود، $p\leq ۰/۰۵$). در روش بررسی بقای سلولی با استفاده از تست MTT، *IC50* کوچک مولکول GW9508 در رده سلولی سرطانی HT-29 و همچنین در سلول‌های نرمال HUVEC تحت تیمار با این ماده، ۵۰۰ میکرومولار ارزیابی شد. نتایج تایید می‌کند که اثرات سیتوتوکسیک این ترکیب بر بقای سلول‌های سرطانی HT-29 و رده نرمال HUVEC وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت، بقای سلولی کاهش یافت.



شکل ۱. نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ اینورت برای سلول‌های HT-29 و HUVEC تیمار شده با GW9508 به مدت ۲۴ ساعت. الف) سلول‌های HT-29 تیمار با GW9508 با غلظت ۵۰۰ میکرومولار ب) سلول‌های HT-29 نمونه کنترل ج) سلول‌های HUVEC تیمار با GW9508 با غلظت ۵۰۰ میکرومولار د) سلول‌های HUVEC نمونه کنترل

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

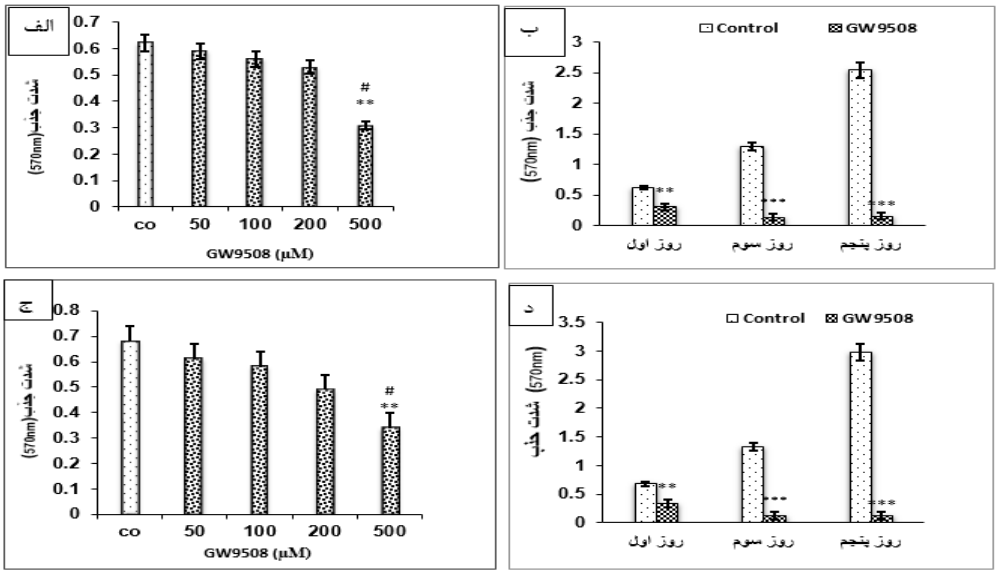
در این روش میزان بقای سلول‌های HT-29 و همچنین سلول‌های HUVEC در روزهای ۱، ۳ و ۵ در گروه تیمار با غلظت (*IC50*: 500µM) کوچک مولکول GW9508 در مقایسه با گروه کنترل منفی هر رده، بررسی شد (p≤۰/۰۵). درصد بقای زیستی سلول‌های سرطانی HT-29 تحت تیمار در روزهای ۱، ۳ و ۵ به ترتیب ۵۱٪، ۱۰/۶٪ و ۶/۱٪ ارزیابی شد. همچنین درصد بقای زیستی سلول‌های نرمال HUVEC تحت تیمار در روزهای ۱، ۳ و ۵ به ترتیب ۴۹/۷٪، ۹/۷٪ و ۴/۳٪ ارزیابی شد. بقای زیستی در سلول‌های تحت تیمار ۵روزه نسبت به سلول‌های تحت تیمار ۳روزه و ۱روزه به طور معنی داری کاهش یافت و همچنین سلول‌های تحت تیمار ۳روزه در مقایسه با سلول‌های تحت تیمار ۱روزه، درصد بقای زیستی کمتری را نشان دادند که این تاییدی بر وابسته به زمان بودن اثر این کوچک مولکول بر سلول‌های HT-29 و HUVEC بود (نمودار ۱).

بررسی تغییرات مورفولوژی هسته سلول‌های تیمار یافته با رنگ‌آمیزی دپی

جهت تایید نتایج مورفولوژی و بقای زیستی اندازه‌گیری شده با تست MTT، از تکنیک رنگ‌آمیزی دپی برای بررسی مورفولوژی هسته‌های سلول‌ها HT-29 و HUVEC در اثر تیمار با GW9508 استفاده شد. سلول‌های HT-29 و HUVEC پس از تیمار ۲۴ ساعته با این کوچک مولکول، با رنگ دپی رنگ‌آمیزی شدند و با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنس با فیلتر بنفش بررسی شدند. هسته سلول‌های HT-29 گروه کنترل منفی، بزرگ، کروی و شفاف مشاهده شد و هسته سلول‌های HT-29 گروه تیمار با این کوچک مولکول، فشرده، متراکم و به‌حالت چروکیده و قطعه‌قطعه که تاییدی بر مرگ سلولی آپوپتوزی در گروه سلولی تیمار شده با کوچک مولکول GW9508 بود (شکل ۲).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت پروتئین در نمونه‌های تحت تیمار و کنترل

جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین در گروه‌های کنترل و گروه‌های تحت تیمار (در هر دو رده سلولی HT-29 و HUVEC) با کوچک مولکول GW9508 از نمودار استاندارد (نمودار ۲) و معادله خط آن، استفاده شد. شدت جذب‌های خوانش شده در سنجش برادفورد به‌جای Y در این معادله قرار می‌گیرد و به این ترتیب میزان پروتئین (X) را می‌توان محاسبه کرد.

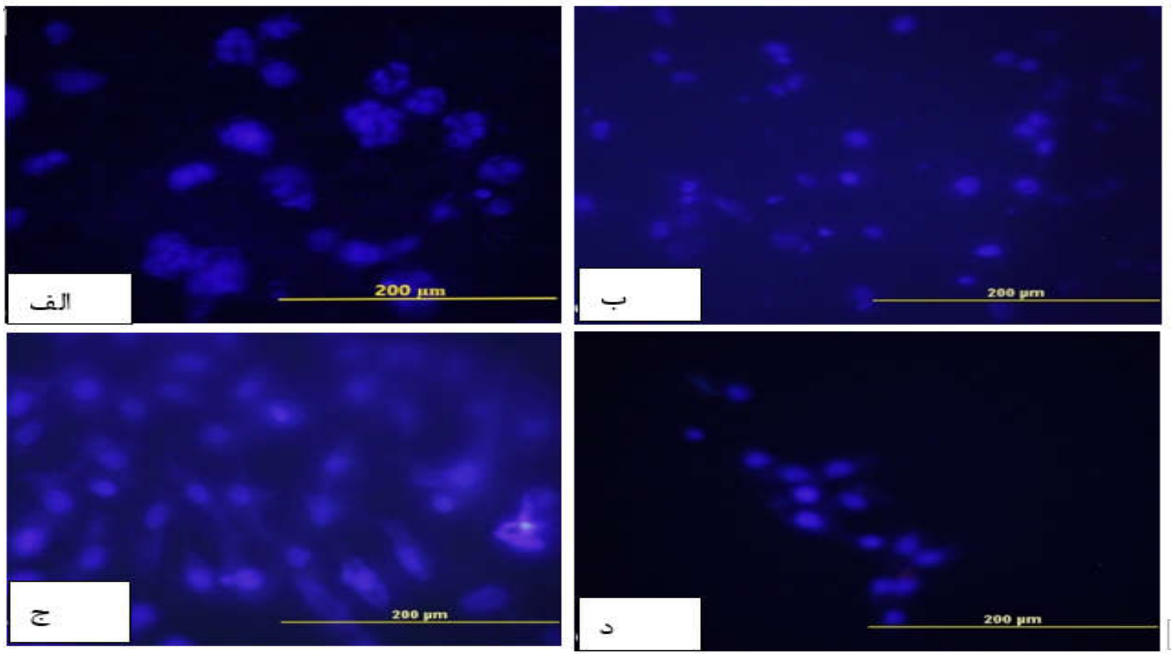


نمودار ۱. مقایسه میانگین میزان جذب در غلظت‌های آزمایش شده‌ی GW9508 در سلول‌های HT-29 و HUVEC در گروه های تیمار ۱، ۳ و ۵ روزه: الف) مقایسه میانگین میزان جذب در غلظت ۵۰۰ میکرومولار GW9508 در رده HT-29 بعد از۲۴ ساعت. ب) مقایسه میانگین میزان جذب در غلظت ۵۰۰ میکرومولار GW9508 در رده HT-29 در روزهای مختلف. ج) مقایسه میانگین میزان جذب در غلظت‌های آزمایش شده‌ی GW9508 بعد از ۲۴ ساعت در سلول‌های HUVEC د) مقایسه میانگین میزان جذب در غلظت ۵۰۰ میکرومولار GW9508 در رده HUVEC در روزهای مختلف. مقادیر میانگین پنج تکرار است (n=۵).

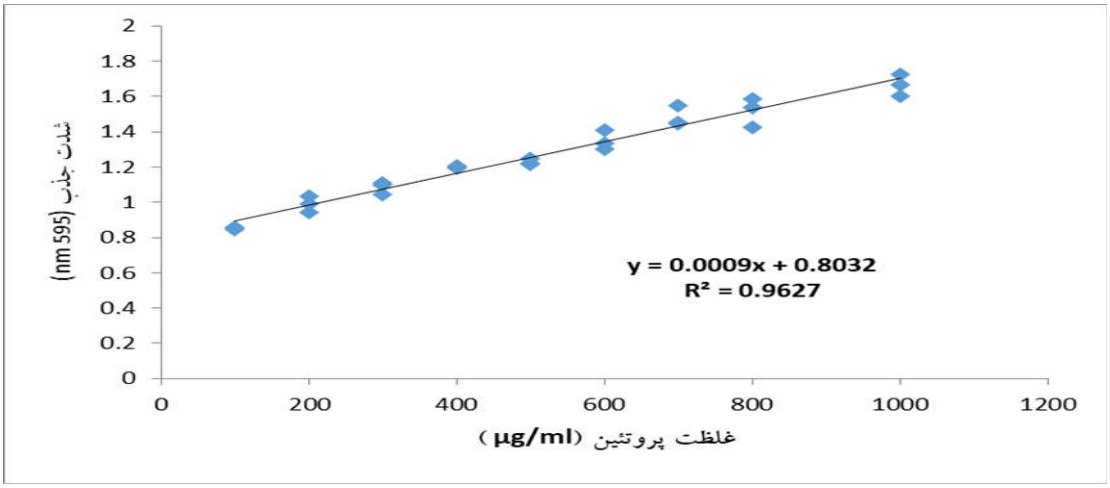
* : بیان‌گر وجود تفاوت معنی دار در سطح اطمینان p<۰/۰۵ می‌باشد.

: غلظت ۵۰۰ میکرومولار به عنوان *IC50* این دارو در تیمار ۲۴ رده HT-29 اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]



شکل۲. بررسی آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی DAPI الف) تیمار سلول‌های HT-29 با غلظت IC50 کوچک مولکول GW9508 ب) سلول-های HT-29 نمونه کنترل ج) تیمار سلول‌های HUVEC با غلظت IC50 کوچک مولکول GW9508 د) سلول‌های HUVEC نمونه کنترل. در گروه‌های کاهش حجم، چروکیدگی و فشردگی هسته سلول‌های تحت تیمار دارو در مقایسه با هسته سلول‌های بزرگ و شفاف گروه کنترل منفی، تاییدی بر آپوپتوز سلول‌هاست.



نمودار ۲. نمودار استاندارد برادفورد

نتایج حاصل از بررسی تغییرات میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز

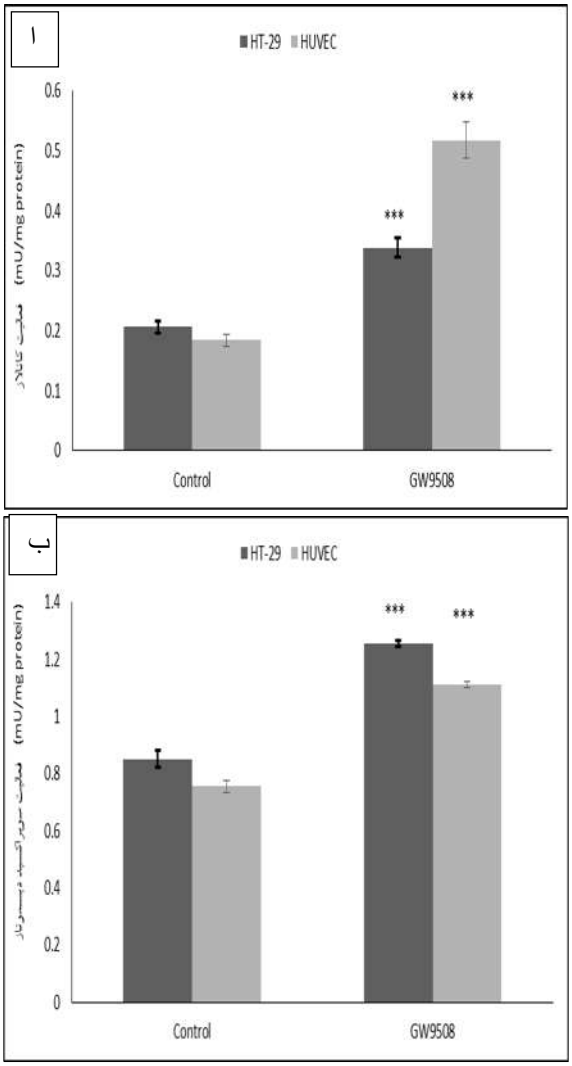
پس از محاسبه میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه کنترل و گروه سلول‌های HT-29 و HUVEC تحت تیمار ۲۴ساعته با غلظت ۵۰۰ میکرومولار تعیین شد.

میزان فعالیت آنزیم SOD در سلول‌های HT-29 تیمار یافته با GW9508 ۱/۲۵۴ mU/mg protein ارزیابی شد. میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه‌های تحت تیمار با GW9508 نسبت به فعالیت SOD در گروه کنترل منفی این رده سرطانی (۰/۸۵ mU/mg protein) به‌صورت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) افزایش یافته بود. همچنین میزان فعالیت آنزیم SOD در سلول‌های HUVEC تیمار یافته با GW9508 ۱/۱۱۱ mU/mg protein ارزیابی شد. فعالیت آنزیم SOD در گروه تحت تیمار با GW9508 نسبت به فعالیت SOD در گروه کنترل منفی(mU/mg protein

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

۰/۷۵۵) به‌صورت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) افزایش یافت (نمودار ۳).

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های HT-29 تیمار یافته با GW9508 ۰/۳۳۸ mU/mg protein ارزیابی شد.



نمودار ۳. مقایسه مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز و SOD در گروه کنترل و تیمار با غلظت IC50 Gw9508 در رده HT-29 و HUVEC بعد از ۲۴ ساعت. الف- فعالیت آنزیم کاتالاز، ب- مقایسه مقدار فعالیت آنزیم SOD. *** بیانگر سطح اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) با گروه کنترل می‌باشد. همچنین حرف غیرمشابه نیز بیان‌گر اختلاف معنی‌دار بین دو گروه تیمار با همدیگر می‌باشد(p<۰/۰۰۱) و مقادیر میانگین دو بار تکرار است(n=۲).

میزان فعالیت این آنزیم درگروه‌های تحت تیمار با GW9508 نسبت به گروه کنترل منفی (mU/mg protein ۰/۲۰۶) به‌صورت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) افزایش یافته بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های HUVEC تیمار یافته با ۰/۵۱۷mU/mg protein ارزیابی شد. میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل منفی(mU/mg protein ۰/۱۸۴) به‌صورت معنی‌داری افزایش داشت (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۳).

افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل منفی در هر دو رده سرطانی و نرمال، بیان‌گر ایجاد استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد سوپراکسید آنیون در سلول‌های HT-29 و HUVEC، در اثر تیمار با کوچک مولکول است. همچنین افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل منفی در هر دو رده سلولی، گواهی است بر تولید ترکیب هیدروژن پراکسید که یکی از گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن است که در القای استرس اکسیداتیو، سمیت و پیشبرد مرگ سلولی آپوپتوزی نقش دارد.

بحث

برخی از داروهای ضدسرطانی باعث القای تولید ROS شده و این استرس اکسیداتیو می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی از جمله هدف قرار دادن مولکول‌های آنکوژن و تاثیر بر مولکول‌های مسیر آپوپتوز سبب مرگ سلولی آپوپتوزی شود و درمان موثری برای این بیماری باشند (۱۸، ۱۹). در مطالعات بالینی پیشین، ارتباط بالقوه‌ای بین اسیدهای چرب غیراشباع و درمان سرطان گزارش شده است (۲۰، ۲۱). لینولئیک اسید کانژوگه یک اسیدچرب غیراشباع با زنجیره کربنی طویل است و در ارتباط با سرطان، نقش درمانی دارد. خواص آنتی‌توموری، ضدتکثیری و سمیت این ترکیب بر بقای انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی مانند کولورکتال، پانکراس، پروستات ثابت شده است (۲۴-۲۲). شواهد و مطالعات نشان داده‌اند که اسیدهای چرب آزاد با زنجیره طویل غیر اشباع با اتصال به گیرنده‌های GPR40 که از نوع گیرنده‌های جفت شونده به Gپروتئین‌ها می‌باشند، می‌توانند فرایندها و تاثیرات سلولی گسترده‌ای از جمله القای مرگ سلولی را در پی داشته باشند (۲۵، ۲۶). به‌عنوان مثال در بسیاری از مطالعات بیان شده است که اسیدچرب غیراشباع امگا۳ از طریق کاهش بیان فاکتور رگ‌زایی VEGF و القای آپوپتوز می‌تواند سبب کاهش رشد سلول‌های سرطان کولون شده و پتانسیل بالایی برای شیمی‌درمانی را دارد. همچنین GPR120 به عنوان رسپتوری برای اسیدهای چرب آزاد با زنجیره طویل غیر اشباع محسوب

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

می شود که نقش مهمی در تنظیم متابولیسم چربی ها و گلوکز دارد. اما نقش این رسپتور در ارتباط با سرطان به وضوح مشخص نشده است. مطالعاتی نشان داده است که فعالیت این رسپتور در برخی از سرطان های کلورکتال سبب پیشبرد القا تومورها گردیده است (۲۹-۲۷).

لینولئیک اسید کانژوگه یک اسید چرب غیراشباع است و اثرات سیتوتوکسیتی و ضدتکثیری در انواع سلول‌ها سرطانی را سبب شده است. در مطالعه Park و همکارانش (۲۰۱۵) تاثیر CLA بر مدل موش مبتلا به سرطان کولون بررسی شد و نتایج تایید کرد که این ترکیب سبب کاهش پیشرفت تومورزایی شده و خاصیت ضدتکثیری آن بر سلول‌های سرطانی کولون تایید شد (۳۰). در دیگر مطالعه‌ای Hiroki و همکارانش (۲۰۰۵) اثرات وابسته به دوز و زمان CLA را بر روی سلول‌های MKN-28 سرطان معده و COLO-320 سرطان کولون بررسی کردند و بیان داشتند که این ماده سبب کاهش بقای زیستی و رشد سلولی از طریق القای آپوپتوز و افزایش بیان ژن Bax، مهار تهاجم و متاستاز می‌شود (۳۱). در همین راستا Rajakangas و همکارانش (۲۰۰۳) در مطالعه‌ای اثرات CLA را روی سرطان کولون آزمایش کرده و اثرات ضدتوموری و کشندگی این ترکیب بر سلول‌های سرطان کولون موش، که باعث مهار سایکلین D1 که فعال‌کننده سنتز DNA و افزایش‌دهنده اندازه تومور است، را اعلام کردند (۳۲).

نتایج ما نشان داد که کوچک‌مولکول GW9508 به صورت وابسته به دوز و زمان سبب مهار رشد و سمیت سلولی در هر دو رده نرمال و سرطانی می‌شود. سلول نرمال HUVEC برخلاف تصور ما، در مواجهه با کوچک‌مولکول GW9508، حساسیت مشابهی (غلظت سیتوتوکسیک و ضد تکثیری کوچک‌مولکول GW9508 در سلول‌های رده HUVEC مشابه با غلظت سیتوتوکسیک این دارو در سلول‌های سرطانی HT-29 بود و غلظت مؤثر GW9508 بر مهار ۵۰ درصدی رشد سلول‌ها (*IC50*)، در هر دو رده‌ی سرطانی HT-29 و نرمال HUVEC، ۵۰۰ میکرومولار ارزیابی شد) با سلول سرطانی نشان داد که احتمالا مربوط به سرعت رشد و تکثیر بالای سلول‌های رده نرمال HUVEC است. بنابراین می‌توان اظهار کرد که GW9508 قادر به ایجاد سمیت وابسته به سرعت تکثیر سلولی است.

در همین راستا، از مجموعه بررسی‌های مورفولوژی و رنگ‌آمیزی DAPI می‌توان دریافت که تیمار GW9508 منجر به فعال شدن روند مرگ سلولی در رده سلول‌های سرطانی HT-29 و نرمال HUVEC شده است.

به منظور بررسی نوع مکانیسم اثر این کوچک‌مولکول، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز (که جزیی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند و در سرکوب گونه‌های فعال اکسیژن نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند) به عنوان مارکر-های زیستی استرس اکسیداتیو بررسی شدند. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های سلولی سرطانی HT-29 و نرمال HUVEC تیمار شده با کوچک مولکول GW9508 نسبت به گروه‌های کنترل منفی، به طور قابل توجه‌ای افزایش یافت، که این نتیجه می‌تواند تاییدی بر مکانیسم سمیت GW9508 از طریق القا تولید ROS باشد.

ROS در سطوح پایین فیزیولوژیکی برای تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی مهم‌اند اما تحت شرایط نرمال سطح ROS تحت کنترل شدید با عوامل آنتی‌اکسیداسیون است. مطالعات و شواهد نشان می‌دهند که سلول‌های سرطانی یک افزایش درون‌زاد یا ذاتی در مقادیر ROS نسبت به‌سلول‌های نرمال دارند که می‌تواند علت‌های مختلفی داشته باشد از جمله فعالیت آنکوژن‌ها؛ که خود سبب افزایش ROS، آسیب به DNA، اختلال در عملکرد پروتئین P53 و متعاقبا تکثیر شدید سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین افزایش فعالیت متابولیسمی در ارتباط با تکثیر غیرقابل کنترل و اختلال در عملکرد زنجیره انتقال اکترون که مرتبط با جهش‌های DNA میتوکندریایی است، از دیگر عوامل افزایش ذاتی ROS در این سلول‌هاست (۳۵-۳۳). این افزایش ذاتی ROS در سلول‌های سرطانی سبب پیش‌برد DNA سلول سرطانی به سمت بی‌ثباتی، جهش و مقاومت دارویی می‌شود و از سوی دیگر اختلال در عملکرد میتوکندری، سبب مهار پاسخ‌های آپوپتوزی سلول به عوامل ضد سرطانی می‌شود (۳۶، ۳۷). از سوی دیگر القای استرس اکسیداتیو و افزایش ROS می‌تواند پاسخ‌های بیولوژیکی متفاوتی از جمله القای مرگ سلولی آپوپتوزی و اتوفاژی را سبب شود. میتوکندری در عین واحد هم هدف و هم منبع ROS است. برخی از داروهای ضدسرطانی با تاثیر بر زنجیره انتقال الکترون میتوکندری سبب القای تولید ROS شده و این استرس اکسیداتیو می‌تواند با تاثیر بر پتانسیل غشایی میتوکندری شروع کننده مرگ سلولی آپوپتوزی باشد. همچنین رژیم‌های آنتی‌اکسیدانی یا N-استیل سیستئین (مهارکننده‌های تولید ROS) که سبب مهار آپوپتوز می‌شوند گواهی بر نقش ROS در القای مرگ سلولی آپوپتوزی است (۳۶، ۳۸). به عنوان مثال Hsu و همکارانش (۲۰۱۱) طی مطالعه‌ای بیان کردند که اسیدهای

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]
[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

چرب غیراشباع نظیر CLA با تولید ROS و القای استرس اکسیداتیو می‌توانند سبب پشبرد مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول‌های توموری پستان موش تیمار یافته با این اسید چرب شوند (۳۹). در همین راستا Fauser و همکارانش (۲۰۱۳)، اثرضدسرطانی Lauric Acid بر رده سرطانی کولون انجام دادند و نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که Lauric Acid خصوصیات آنتی‌نئوپلاستیک قابل توجه ای داشته که شامل القای آپوپتوز به دنبال تولید ROS و تغییرسطح گلوتاتیون (GSH) است (۱۲). همچنین Pierre و همکارانش (۲۰۱۳) اثرات Trans-10, cis-12 CLA را بر القای مرگ سلولی در سرطان کولون انسانی مطالعه کردند و بیان داشتند که این ماده از طریق افزایش تولید ROS سبب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون می‌شود (۱۱). از این رو، علیرغم تاثیرات منفی افزایش ذاتی در سطح ROS در تومورزایی در سلول‌های سرطانی، امکان استفاده از این ویژگی بیوشیمیایی برای هدف‌های درمانی جدید از طریق مکانیسم‌های وابسته به استرس اکسیداتیو مطرح می‌باشد. سلول‌های نرمال سطوح پایین‌تری از ROS را دارند و به‌همین دلیل ظرفیت بالاتری برای مقابله با استرس اکسیداتیو نسبت به سلول سرطانی را دارند و اثر سمیت بر سلول‌های سالم کمتر است و این امر استفاده از داروهایی که مستقیم یا غیرمستقیم سبب افزایش استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی برای از میان برداشتن آنها می‌شود را توجیه می‌کند. سازوکار داروها و عوامل ضدسرطانی که برای ایجاد استرس اکسیداتیو بیشتر و القای مرگ سلولی ناشی از آن برای درمان سرطان تجویز می‌شوند شامل قرار گرفتن مستقیم سلول‌ها در معرض آن دسته از داروها و عوامل تولید کننده ROS، داورهای که سبب مهار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش ROS ناشی از این امر می‌شوند و یا ترکیبی از این استراتژی می‌باشد (۳۶).

در پژوهش حاضر، اثرات کوچک مولکول GW9508 بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولورکتال انسانی و سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف بررسی شد. نتایج به دست آمده از بخش سلولی و سنجش آنزیمی این پژوهش تایید کرد که کوچک مولکول GW9508 سبب القای مرگ سلولی آپوپتوزی وابسته به استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی کولورکتال می‌شود و می‌تواند در درمان بدخیمی‌های روده بزرگ به صورت وابسته به دوز و غلظت موثر بوده و مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

هزینه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهانه سال ۹۸ معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تامین شده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت‌های مالی اعلام می‌دارد.

REFERENCES

1. Hoseini S, Moaddabshoar L, Hemati S, Mohammadianpanah M. An Overview of Clinical and Pathological Characteristics and Survival Rate of Colorectal Cancer in Iran. Ann Color Res 2014; 2:1–8.

2. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. CA Cancer J Clin 2005; 55:178–94.

3. Chun J, Kang M, Kim YS. A triterpenoid saponin from Adenophora triphylla var. japonica suppresses the growth of human gastric cancer cells via regulation of apoptosis and autophagy. Tumour Biol 2014;35:12021-30.

4. Fauser JK, Prisciandaro LD, Cummins AG, Howarth GS. Fatty acids as potential adjunctive colorectal chemotherapeutic agents. Cancer Biol Ther 2011; 11:724–31.

5. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. Nat Rev Drug Discov 2010; 9:447.

6. esik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. Nat Rev Cancer 2005;5:876-85

7. Fujita T, Matsuoka T, Honda T, Kabashima K, Hirata T, Narumiya S. A GPR40 agonist GW9508 suppresses CCL5, CCL17, and CXCL10 induction in keratinocytes and attenuates cutaneous immune inflammation. J Invest Dermatol 2011; 131:1660–7.

8. Fukushima K, Yamasaki E, Ishii S, Tomimatsu A, Takahashi K. Biochemical and Biophysical Research Communications Different roles of GPR120 and GPR40 in the acquisition of malignant properties in pancreatic cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2015; 8–11.

9. Gao B, Huang Q, Jie Q, Wang L, Zhang H, Liu J, et al. Biochimie Dose-response estrogen promotes osteogenic differentiation via GPR40 (FFAR1) in murine BMMSCs. Biochimie 2015;110:36–44.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]

[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

10. Philippe C, Wauquier F, Léotoing L, Coxam V, Wittrant Y. GW9508 , a free fatty acid receptor agonist , speci fi cally induces cell death in bone resorbing precursor cells through increased oxidative stress from mitochondrial origin. Exp Cell Res 2013; 319:3035–41.

11. Pierre AS, Minville-Walz M, Fèvre C, Hichami A, Gresti J, Pichon L, et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species-mediated ER stress. Biochim Biophys Acta 2013;1831:759-68.

12. Fauser JK, Matthews GM, Cummins AG, Howarth GS. Induction of Apoptosis by the Medium-Chain Length Fatty Acid Lauric Acid in Colon Cancer Cells due to Induction of Oxidative Stress. Chemotherapy 2013; 59: 214–24.

13. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease; that is a question. Cancer Biol Ther 2008; 7:1875–84.

14. Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J. Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. Free Radic Biol Med 2013; 63:207–21.

15. Wen X, Wu J, Wang F, Liu B, Huang C, Wei Y. Free Radical Biology and Medicine Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. Free Radic Biol Med 2013; 65:402–10.

16. Kono Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. Arch Biochem Biophys 1978; 186:189–95.

17. Koroliuk MA, Ivanova LI, Maĭorova IG, Tokarev VE. Metod opredeleniia aktivnosti katalazy [A method of determining catalase activity]. Lab Delo 1988:16-9. [In Russian]

18. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. Curr Oncol 2011;18:18.

19. Stordal B, Pavlakis N, Davey R. Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. Cancer Treat Rev 2007; 33:347–57.

20. Conklin KA. Dietary polyunsaturated fatty acids: impact on cancer chemotherapy and radiation. Altern Med Rev 2002; 7:4–22.

21. Serini S, Piccioni E, Merendino N, Calviello G. Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. Apoptosis 2009; 14:135–52.

22. Palombo JD, Ganguly A, Bistrian BR, Menard MP. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. Cancer Lett 2002; 177:163–72.

23. Cho HJ, Kim EJ, Lim SS, Kim MK, Sung M-K, Kim J-S, et al. Trans-10, cis-12, not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid inhibits G1-S progression in HT-29 human colon cancer cells. J Nutr 2006; 136:893–8.

24. Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. Anticancer Res 1998; 18:1429–34.

25. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. JNCI J Natl Cancer Inst 1981; 66:1192–308.

26. Milligan G, Shimpukade B, Ulven T, Hudson BD. Complex pharmacology of free fatty acid receptors. Chem Rev 2016; 117:67–110.

27. Fan Y-Y, Ran Q, Toyokuni S, Okazaki Y, Callaway ES, Lupton JR, et al. Dietary fish oil promotes colonic apoptosis and mitochondrial proton leak in oxidatively stressed mice. Cancer Prev Res 2011; 4:1267–74.

28. Wu Q, Wang H, Zhao X, Shi Y, Jin M, Wan B, et al. Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumor-promoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma. Oncogene 2013; 32: 5541-5550.

29. Touil Y, Igoudjil W, Corvaisier M, Dessein A-F, Vandomme J, Monté D, et al. Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. Clin cancer Res 2014; 20:837–46.

30. Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park JHY. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1, 2-dimethylhydrazine-treated rats : A possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. Br J Nutr 2011; 86:549-55.

31. Kuniyasu H, Yoshida K, Sasaki T, Sasahira T, Fujii K, Ohmori H. Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells Int J Cancer 2006; 576:571–6.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]

[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]

32. Rajakangas J, Basu S, Salminen I, Mutanen M. Adenoma growth stimulation by the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) is associated with changes in mucosal NF-κB and cyclin D1 protein levels in the Min mouse. J Nutr 2003; 133:1943–8.

33. Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. Science 2000; 287:2017–9.

34. Kang D, Hamasaki N. Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. Clin Chem Lab Med 2003; 41:1281–8.

35. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. Mol Cell 2002; 9:1031–44.

36. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist Updat 2004; 7:97–110. doi: 10.1016/j.drup.2004.01.004.

37. Fojo T. p53 as a therapeutic target: unresolved issues on the road to cancer therapy targeting mutant p53. Drug Resist Updat 2002; 5:209–16.

38. Sastre J, Pallardó F V, Viña J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. IUBMB Life 2000; 49:427–35.

39. Hsu Y, Ip MM. Conjugated linoleic acid-induced apoptosis in mouse mammary tumor cells is mediated by both G protein coupled receptor-dependent activation of the AMP-activated protein kinase pathway and by oxidative stress. Cell Signal 2020; 23:2013–20.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1401.32.1.1.6]

[DOI: 10.52547/iau.32.1.31]