Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:38 IRDT on Saturday July 29th 2017

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، خرداد ۱۳۹۳، دوره ۷۲، شماره ۳، صفحه‌های ۱۳۹ تا ۱۴۶ مقاله اصیل

حساسیت پرتویی سلول‌های سرطان کولورکتال مقاوم به پرتو پس از تیمار با دوکوزاهگزانویک اسید و پرتو گاما

فریده حسینی[۱]، محمدرضا سام[۲و۳*]
نصراله جباری[۴]

۱- گروه تکنولوژی پرتوشناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- گروه زیست فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۴- گروه تصویربرداری پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: ارومیه، خیابان شهید بهشتی، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست فناوری
تلفن: ۰۴۴۱-۳۴۴۰۱۹۹
E-mail: s_mohammadreza@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۱۷ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰ آنلاین: ۱۳۹۳/۲/۱۵

زمینه و هدف: از پرتودرمانی در درمان بسیاری از سرطان‌ها استفاده می‌شود. پرتودرمانی عوارض جانبی بالایی دارد. ترکیبات حساس‌کننده پرتوی، تکثیر سلول‌های توموری و نیز دوز پرتوی در پرتودرمانی را کاهش می‌دهند. دوکوزاهگزانویک اسید (DHA) روغن ماهی اثر ضد تکثیری بر سلول‌های بدخیم دارد. در این مطالعه، اثر ترکیبی DHA و پرتو گاما بر رشد و بقا سلول‌های کولورکتال HT-29 بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی، سلول‌های بدخیم در محیط کشت کامل در تعداد $10^5 \times 5$ در پلیت شش خانه‌ای به‌مدت یک روز کشت داده شدند و با دو غلظت ۵۰ یا ۱۰۰ µM DHA به‌مدت چهار ساعت تیمار و در دوزهای دو و ۱۰ گری پرتودهی شدند. میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس‌از ۴۸ ساعت با رنگ‌آمیزی تریپان بلو بررسی شد. همچنین سلول‌های بدخیم ابتدا با ۵۰ یا ۱۰۰ µM DHA به‌مدت ۴۸ ساعت تیمار و سپس با دوزهای ۱۰-۲ گری پرتودهی شدند و پس‌از شش روز میزان بقا توسط آزمون MTT بررسی شد.

یافته‌ها: میزان زنده‌مانی در تیمار همزمان سلول‌ها با ۵۰ و ۱۰۰ µM DHA و دوز پرتوی دو و ۱۰گری به‌ترتیب به ۵۹/۸٪، ۱۷/۵٪، ۴۷٪ و ۱۳/۹٪ کاهش یافت. تیمار سلول‌ها با DHA به‌همراه دوزهای افزاینده دو، چهار، شش، هشت و ۱۰ گری پرتو گاما میزان بقا سلول‌های بدخیم را به‌ترتیب ۷۹/۱٪، ۵۷/۶٪، ۴۲/۸٪، ۴۰/۵٪ و ۳۴٪ برای ۵۰ µM DHA و ۵۵/۸٪، ۴۳/۷٪، ۳۳/۶٪، ۲۷/۹٪ و ۲۳/۵٪ برای ۱۰۰ µM DHA رساند.

نتیجه‌گیری: DHA می‌تواند به‌عنوان داروی حساس‌کننده سلول‌های سرطان کولورکتال در پرتودرمانی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پرتودرمانی، پرتو گاما، سرطان کولورکتال، دوکوزاهگزانویک اسید (DHA)، HT-29.

مقدمه

در یک قرن گذشته از پرتودرمانی جهت درمان سرطان استفاده فراوانی شده است.[۱] پرتودرمانی در کاهش عود مجدد سرطان، کنترل تومور و در نهایت افزایش امید به زندگی بیمار مؤثر است.[۲] از جمله سرطان‌هایی که در درمان آن از پرتودرمانی استفاده می‌شود، سرطان کولورکتال است. سرطان کولورکتال از سرطان‌های شایع در جهان محسوب می‌شود که شیوع آن بیشتر در سنین بالاتر از ۵۰ سال دیده می‌شود.[۳] متاسفانه میزان شیوع این سرطان در ایران نیز بالا بوده و سن ابتلا به آن در کشورمان پایین‌تر از کشورهای غربی است.[۴و۵] این سرطان بر طبق مرحله پیشروی بیماری، روش‌های درمانی مختلفی دارد که درمان جراحی درمان اصلی بوده و در موارد پیشرفته‌تر، درمان‌های کمکی شامل شیمی‌درمانی و پرتودرمانی انجام می‌پذیرد. با این وجود پاسخ به این درمان‌ها بستگی به مرحله بیماری داشته و در ۸۵٪ موارد بیماران پس‌از دو سال از درمان با عود مجدد بیماری مواجه می‌شوند.[۶] هدف در پرتودرمانی رساندن بیشترین دوز پرتو به تومور و کمترین

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:38 IRDT on Saturday July 29th 2017

دوز به بافت‌های سالم بدن می‌باشد. با توجه به اثرات مخرب پرتو چه در زمان درمان و چه عوارض بلندمدت آن، استفاده از عواملی که حساسیت سلول‌های سرطانی را نسبت به پرتو افزایش دهد، می‌تواند سبب کاهش دوز درمانی در رادیوتراپی شود که این امر منجر به افزایش کارایی پرتودرمانی بر سلول‌های سرطانی و افزایش کیفیت زندگی و بقا بیمار خواهد شد. عوامل شیمی‌درمانی خود به‌عنوان داروهای حساس‌کننده پرتوی محسوب می‌شوند. با این وجود این داروها عوارض جانبی فراوانی از جمله سرکوب مغز استخوان، افزایش موکوس، التهاب پوستی، اسهال و غیره را به بیمار تحمیل می‌کنند.[۷] استفاده از ترکیبات طبیعی با خواص ضد سرطانی که ضمن افزایش حساسیت پرتوی سلول‌های بدخیم عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی را کاهش دهد، می‌تواند با کاهش دوز پرتو درمانی، کاهش عوارض ناشی از آن را بدون تحمیل عوارض و پیامدهای آن در پی داشته باشد. بر طبق مطالعات، سرطان کولورکتال وابستگی فراوانی به عوامل محیطی از جمله تغذیه دارد. نشان داده شده است که در جوامعی که اسیدهای چرب امگا-۳ به‌میزان کافی استفاده می‌گردد، میزان شیوع این سرطان پایین است.[۸و۹] بر همین مبنا اثر ضد سرطانی اسیدهای چرب امگا-۳ در مطالعات مختلفی بررسی شده و به‌عنوان یک عامل طبیعی و غیرسمی در درمان سرطان مطرح شده است که برای انسان قابل تحمل بوده و در طی مطالعات کارآزمایی بالینی عوارض جانبی از خود بروز نداده است.[۱۰-۱۲]

دوکوزاهگزانویک (DHA) به‌عنوان یکی‌از اسیدهای چرب امگا-۳ روغن ماهی از رشد تومورهای القاشده توسط کارسینوژن‌ها جلوگیری می‌کند.[۱۳-۱۶] همچنین مطالعات بر روی رده‌های سلولی و حیوانات، نشان داده است که استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳ سبب افزایش حساسیت دارویی در برابر برخی داروهای ضد سرطانی شده است.[۱۷-۱۹] مطالعات نشان داده‌اند که DHA در ترکیب با داروهای شناخته شده ضد سرطان اثر هم افزایی ضد سرطانی از خود نشان می‌دهد.[۲۰-۲۲] علاوه براین، پژوهشگران نشان داده‌اند که درمان ترکیبی پرتوهای یونیزان به‌همراه اسید چرب امگا-۳، سلول‌های سرطانی را نسبت به مرگ حساس‌تر کرده است. در همین زمینه، تاثیر افزایشی در مرگ سلول‌های سرطانی به‌وسیله درمان ترکیبی پرتو با DHA نشان داده شده است.[۲۳و۲۴] با توجه به موارد بیان‌شده در بالا، در این مطالعه اثر حساس‌کنندگی پرتوی DHA بر روی رده سلولی سرطان کولورکتال مقاوم به پرتو، مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی و در آزمایشگاه کشت سلول، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ انجام گردید.

رده سلولی و مواد شیمیایی مورد نیاز: رده سلولی مقاوم به پرتو سرطان کولورکتال HT-29 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. محیط کشت سلولی RPMI-1640، سرم جنین گاوی (FBS) و تریپسین ۰/۲۵٪ از PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria تهیه شدند. DHA، ماده MTT، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) و محلول تریپان بلو از Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA تهیه شدند.

کشت سلول‌های بدخیم: سلول‌های بدخیم در محیط کشت RPMI-1640 غنی‌شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی و حاوی ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها دو بار در هفته تعویض شد و سلول‌ها در تراکم سلولی ۸۰٪، با استفاده از محلول تریپسین ۰/۲۵٪ تریپسینه شده و پاساژ داده شدند. شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار صورت گرفت. شرایط نگهداری سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ °C، رطوبت ۸۰٪ و ۵٪ دی‌اکسیدکربن بود. برای انجام آزمون‌ها از سلول‌هایی که در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند استفاده گردید.

تیمار سلول‌های بدخیم با DHA و پرتودهی آنها: سلول‌های بدخیم در تعداد ۱۰,۰۰۰-۵۰۰۰ سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از گذشت یک روز، تیمار سلول‌ها در دو غلظت ۵۰ µM و ۱۰۰ µM DHA به‌مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. سپس پلیت‌های کشت با استفاده از منبع کبالت-۶۰ دستگاه Theratron Phoenix, Best Theratronics Ltd., Ottawa, Canada مرکز پرتودرمانی امید شهر ارومیه و بر حسب اندازه فیلد تابش با میزان "Output" برابر با ۴۶/۶۱ cGy/min در دوزهای دو، چهار، شش، هشت و ۱۰ گری با پرتو گاما پرتودهی شدند. پس از پرتوتابی، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت بدون DHA تعویض گردید و سلول‌ها به‌مدت شش روز کامل در حالی‌که پس از دومین روز، هر روز تعویض محیط می‌شدند، کشت داده شدند.

محاسبه زمان دو برابر شدن سلول‌ها: سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه‌ای به‌تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول در محیط کشت کامل کشت داده شدند. سپس به‌مدت هشت روز، هر ۲۴ ساعت سلول‌ها تریپسینه شده و برای رسم

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:38 IRDT on Saturday July 29th 2017

منحنی رشد و محاسبه زمان دو برابر شدن توسط لام نئوبار شمارش شدند. با توجه به اینکه سلول‌ها در محیط کشت به‌صورت تصاعدی افزایش می‌یابند، براساس فرمول $N_H= N_I\times2^n$، افزایش تعداد سلول‌ها محاسبه شد. N_H تعداد سلول‌های جمع‌آوری‌شده در مدت زمان موردنظر، N_I تعداد سلول‌های اولیه و n تعداد تقسیمات سلولی است. سپس با تقسیم مدت زمانی که سلول‌ها در کشت بودند بر تعداد تقسیمات انجام‌شده، زمان دو برابر شدن سلول‌ها محاسبه شد.

آزمون زنده‌مانی (Viability): سلول‌ها به تعداد 5×10^5 در پلیت شش خانه‌ای کشت داده شدند. پس از چهار ساعت تیمار با دو غلظت ۵۰ µM و ۱۰۰ µM DHA، پلیت‌ها با دو دوز پرتوی دو و ۱۰ گری پرتودهی شدند. پس‌از ۴۸ ساعت، سلول‌ها تریپسینه شدند. سپس مقدار ۵۰ µl از سوسپانسیون سلولی با ۵۰ µl رنگ تریپان بلو مخلوط شد و به‌مدت یک دقیقه سلول‌ها در شرایط محیط آزمایشگاه انکوبه شدند. سپس با استفاده‌از لام نئوبار شمارش سلول‌ها انجام شد. میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده‌از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{زنده‌مانی (٪)} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده و رنگ نگرفته}}{\text{تعداد سلول‌های مرده رنگ گرفته + تعداد سلول‌های زنده رنگ نگرفته}} \times 100$$

آزمون MTT: پس‌از تیمار دارویی سلول‌های بدخیم، آزمون MTT به‌روش زیر انجام پذیرفت. سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با محیط کشت تازه RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. سپس برای انجام آزمون، محیط کشت تمام چاهک‌ها با محیط کشت تازه بدون سرم جنین گاوی تعویض گردید و ۲۰ µl محلول MTT (۵ mg/ml) به هر چاهک افزوده شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ °C به‌مدت چهار ساعت انکوبه شدند. پس‌از سپری‌شدن مدت زمان فوق، محیط رویی سلول‌ها با احتیاط خارج شده و به‌میزان ۲۰۰ µl DMSO به هر چاهک افزوده شد. دوباره پلیت‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ °C انکوبه شدند. در پایان، محیط کشت درون چاهک‌ها با سمپلر به‌صورت یکنواخت و همگن درآمده و پس‌از انکوباسیون پنج دقیقه‌ای، جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه خواننده الایزا (Biotec, USA) و در طول موج ۴۹۲ ثبت گردید. سپس میزان رشد به‌طریقه زیر محاسبه شد.

$$\text{رشد و بقا (٪)} = \frac{\text{جذب نوری نمونه کنترل بدون سلول - جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری نمونه کنترل بدون سلول - جذب نمونه کنترل تیمار نشده}} \times 100$$

جهت مقایسه میانگین نتایج کمی و مقایسه آنها با یکدیگر، از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مقایسات چندگانه توکی (Tukey) استفاده شد. در همه محاسبات، $P<0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

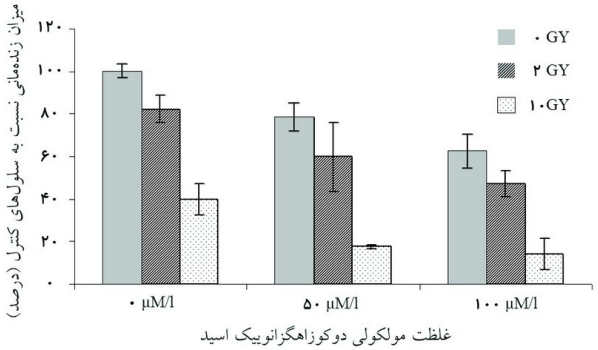
یافته‌ها

میزان زنده‌مانی سلول‌های بدخیم در تیمار همزمان سلول‌ها با DHA و پرتو گاما: بر طبق نتایج به‌دست‌آمده، افزایش دوز پرتو و افزایش غلظت DHA، هر کدام به‌تنهایی سبب کاهش معنادار در میزان زنده‌مانی سلول‌ها گردید و تیمار ترکیبی سلول‌ها با پرتو و DHA اثر بیشتری بر کاهش زنده‌مانی سلول‌ها داشت. بیشترین تاثیر در غلظت ۱۰۰ µM DHA و دوز پرتوی ۱۰ گری مشاهده گردید. سلول‌هایی که تنها غلظت ۱۰۰ µM DHA را دریافت نموده بودند، میزان زنده‌مانی سلولی ۶۲/۶٪ محاسبه گردید. همچنین در سلول‌هایی که تنها دوز ۱۰ گری پرتو گاما دریافت کرده بودند، میزان زنده‌مانی سلول‌ها ۳۹/۶٪ محاسبه شد، با به‌کار بردن تیمار همزمان دوز ۱۰ گری پرتو و غلظت ۱۰۰ µM DHA، میزان زنده‌مانی سلول‌های بدخیم بیش از بیش کاهش یافت و به ۱۳/۹٪ سلول‌های کنترل رسید (نمودار ۱).

تعیین میزان حساسیت آزمون MTT: جهت تعیین محدوده حساسیت آزمون MTT، سلول‌های بدخیم در تعداد مختلف ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند و آزمون MTT بر روی آنها انجام پذیرفت. بر طبق نمودار ۲، تعداد سلول مورد نیاز جهت آزمون ۲۵۰۰ سلول تعیین شد.

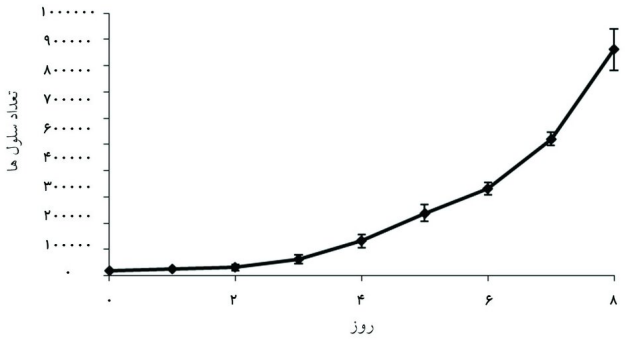
محاسبه زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی: جهت رسم منحنی بقا لازم است مدت زمانی که سلول‌ها پس‌از پرتوتابی نیاز دارند تا رشد و تکثیر یابند، محاسبه گردد. جهت این کار نیاز به داشتن و محاسبه زمان دو برابرشدن سلول‌ها است. برای این منظور در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای 2×10^4 سلول کشت داده شدند و در هر ۲۴ ساعت سلول‌های چاهک‌ها پس‌از تریپسینه شدن شمارش گردیدند. این کار تا هشت روز ادامه یافت و در نهایت تعداد سلول‌ها ثبت گردید و نمودار رشد سلول‌ها طی هشت روز رسم شد. با استفاده‌از فرمول آورده شده در قسمت مواد و روش‌ها، زمان دو برابر شدن سلول‌های HT-29 برابر با ۱۹/۷ ساعت به‌دست آمد (نمودار ۳).

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:38 IRDT on Saturday July 29th 2017

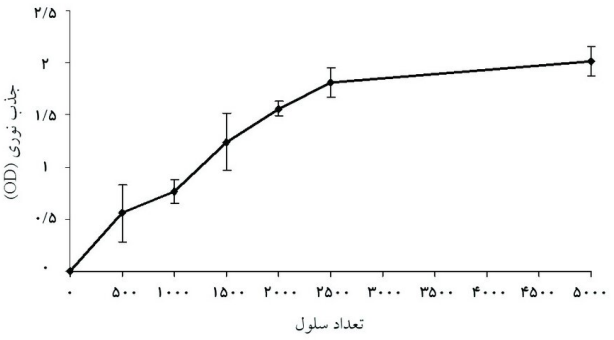


نمودار ۱: آزمون زنده‌مانی سلول‌ها پس‌از ۴۸ ساعت تیمار با DHA و پرتو گاما

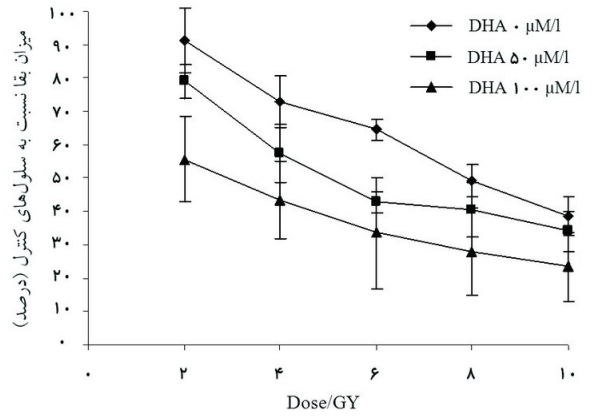
میزان زنده‌مانی نسبت به سلول‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده) محاسبه شده است.



نمودار ۳: رشد سلول‌های HT-29 در طول هشت روز



نمودار ۲: تعیین محدوده حساسیت آزمون MTT



نمودار ۴: ارزیابی میزان بقا سلول‌های HT-29 در هفتمین روز پس‌از تیمار بـا DHA و پرتو گاما میزان بقا نسبت به سلول‌های کنترل بدون تیمار دارویی و پرتوی محاسبه شد.

اثر تیمار سلول‌های بدخیم با DHA و پرتو گاما بر میزان بقا سلول‌های بدخیم: پس‌از ۴۸ ساعت تیمار سلول‌های بدخیم با دو غلظت ۵۰ µM و ۱۰۰ µM DHA و سپس پرتوتابی در دوزهای دو، چهار، شش، هشت و ۱۰ گری با اشعه گامای کبالت-۶۰ و نیز سپری شدن شش روز کامل (زمان لازم برای هفت برابر شدن سلول‌های HT-29)، بقا سلول‌ها، در مقایسه با گروه کنترل که پرتو دریافت نکرده بودند محاسبه گشت و به‌صورت درصدی از سلول‌های کنترل نشان داده شد. به‌طور طبیعی با افزایش میزان دوز پرتو، میزان بقا سلول‌ها کاهش یافت. با این وجود مشاهده شد در گروهی از سلول‌های سرطانی که قبل‌از پرتوتابی با DHA تیمار شده بودند میزان بقا در دوزهای یـکسان پرتو به نسبت سلول‌هایـی که با DHA تیـمار نشده بودند کاهش بیشتری یافته است و این میزان کاهش با افزایش غلظت DHA بیشتر شده است. در واقع سلول‌هایی که علاوه‌بر پرتو، DHA ۵۰ µM دریافت کرده‌اند میزان بقا کمتری را نسبت به حالت دریافت‌کننده پرتو به‌تنهایی نشان دادند. زمانی‌که از غلظت بالاتر DHA ۱۰۰ µM استفاده شد، میزان بقا به‌میزان بیشتری کاهش یافت. با توجه به یافته‌های نمودار ۱ و ۴، مشاهده می‌شود که غلظت DHA ۵۰ µM توانسته است میزان بقا را در سلول‌ها کاهش داده و حساسیت سلول‌های HT-29 را نسبت به پرتو افزایش دهد و این اثر حساس‌کنندگی، با افزایش غلظت DHA به ۱۰۰ µM، افزایش یافته است (نمودار ۴).

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:38 IRDT on Saturday July 29th 2017

بحث

پرتودرمانی نقش برجسته‌ای در درمان اکثر سرطان‌ها دارد. هدف در پرتودرمانی رساندن حداکثر پرتو به تومور با کمترین میزان آسیب به بافت‌های سالم بدن می‌باشد. از این‌رو کاربرد عواملی که بتوانند سلول‌های توموری را نسبت به پرتو حساس کرده و در کل دوز پرتوی رسیده به بیمار را به‌حداقل ممکن برساند مورد توجه است. در این بین کاربرد عواملی که طبیعی بوده، فاقد عوارض جانبی در دوزهای کاربردی باشد و در دسترس و ارزان‌قیمت نیز باشد بسیار مطلوب است. در مطالعات انجام‌شده اثرات ضد سرطانی اسیدهای چرب امگا-۳ نشان داده شده است.[۱۳-۱۶] همچنین نشان داده شده است که اسیدهای چرب امگا-۳ سلول‌های بدخیم را نسبت به عوامل شیمی‌درمانی و پرتو حساس‌تر کرده است.[۱۷-۲۴] در یک مطالعه، Shao اثر روغن ماهی را بر پاسخ سلول‌های کارسینومای پستان به داروی شیمی‌درمانی میتومایسین در موش بررسی کرد و اعلام کرد تعویض لیپیدهای غشای فسفولیپیدی سلول‌های تومور با اسیدهای چرب اشباع نشده حاصل‌از روغن ماهی، سبب افزایش حساسیت تومور در برابر استرس‌های اکسیداتیو می‌شود و نشان داد که مصرف همزمان روغن ماهی و میتومایسین در موش‌های حامل سلول‌های کارسینومای پستان انسانی نه‌تنها سبب کاهش رشد تومور می‌شود بلکه پاسخ تومور به میتومایسین را نیز افزایش می‌دهد.[۱۹] در مطالعه‌ای دیگر پژوهشگران نشان دادند که هر دو عامل DHA و پرتو یونیزان رشد سلول‌های توموری را با افزایش استرس‌های اکسیداتیو سرکوب می‌کنند.[۲۵]

در همین راستا تاثیر افزایشی در مرگ سلول‌های بدخیم لنفوما را به‌وسیله تیمار ترکیبی DHA و پرتو یونیزان نشان داده‌اند.[۲۳] در مطالعه دیگر، Wen، تاثیر تیمار DHA در ترکیب با پرتو یونیزان بر بافت نرمال و رشد سلول‌های سرطانی سر و گردن را مورد بررسی قرار داد. وی نشان داد که در تیمار سلول‌ها با DHA رشد تومور سرکوب شده و این اثر زمانی که با پرتودهی همراه باشد، بیشتر می‌گردد.[۲۶] در همین زمینه Kikawa، اثر تیمار ترکیبی پرتو و DHA را بر میزان رشد و تکثیر سلول‌های آدنوکارسینومای مقاوم به پرتو ریه، همینطور میزان القای آپوپتوز در آنها را مورد بررسی قرار داد و مشاهده کرد که از رشد سلول‌های سرطانی ریه جلوگیری شده و میزان آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در آنها افزایش یافته است. وی در این مطالعه نقش DHA را به‌عنوان یک حساس‌کننده پرتوی مطرح کرد.[۲۷] در این مطالعه ما اثر حساس‌کنندگی پرتوی DHA را بر روی سلول‌های سرطانی کولورکتال مقاوم به پرتو مورد بررسی قرار دادیم. بر طبق آزمون زنده‌مانی با افزایش دوز پرتو، میزان زنده‌مانی سلول‌های بدخیم کاهش می‌یابد. همچنین در تیمار با DHA و بدون تیمار پرتوی، تغییرات معناداری در میزان کاهش رشد سلول‌های بدخیم مشاهده شد. در صورتی‌که سلول‌ها همزمان با DHA و پرتو تیمار گردیدند، اثر هم‌افزایی در میزان مرگ سلولی و کاهش تکثیر سلولی مشاهده گردید که از این نظر مطابق مطالعات ذکر شده در بالا بود. بر طبق آزمون MTT، با مقایسه میزان دوز پرتوی اعمال شده مشاهده می‌شود میزان دوز پرتوی مورد نیاز برای اینکه ۵۰٪ سلول‌ها زنده بمانند حدود هشت گری است که در صورت تیمار سلول‌ها با ۵۰ μM DHA، این مقدار دوز پرتوی بین چهار و شش گری قرار می‌گیرد و در تیمار با دوز ۱۰۰ μM DHA، این دوز پرتو به حدود دو گری می‌رسد.

تکنیک‌های آزمایشگاهی متعددی برای اندازه‌گیری میزان بقا سلول‌های سرطانی به‌کار رفته است. روش ارزیابی تشکیل کلونی به‌عنوان روشی مطمئن برای بررسی حساسیت پرتوی سلول‌ها و رسم منحنی بقا مورد استفاده قرار گرفته است.[۲۸] اما این روش معایبی از جمله وابسته بودن به تشکیل کلونی و در نتیجه متکی بودن به سلول‌هایی که قدرت تکثیرشان را تا زمان حدود ۲-۱ هفته حفظ کنند، کارایی کم در پلیتینگ، آرتیفکت کلمپینگ و صرف زمان طولانی می‌باشد. به‌کارگیری روش‌های آزمایشگاهی که قابل اعتماد و سریع بوده و پیش‌بینی درستی از پاسخ تومور به درمان را نشان دهد بسیار مطلوب است. از روش‌های آزمایشگاهی سریع که در آن نیازی به کلونی‌زایی نیست، استفاده از آزمون‌های بررسی رشد سلولی است که شامل روش‌های متعدد اندازه‌گیری میزان رشد سلول‌ها در محیط کشت است.

برخی روش‌های ارزیابی میزان زنده بودن سلول‌ها شامل رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و اندازه‌گیری برداشت مواد رادیواکتیو هر کدام دارای مشکلاتی از جمله عدم حساسیت مناسب است (در روش تریپان بلو) و خطر مواد رادیواکتیو (در روش بهره‌گیری از برداشت مواد رادیواکتیو) می‌باشند. آزمون MTT روش آزمایشگاهی برای

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:38 IRDT on Saturday July 29th 2017

ارزیابی تکثیر سلولی است که طی چند مطالعه به‌صورت مقایسه‌ای با روش تشکیل کلونی مقایسه شده و به‌عنوان روشی قابل اعتماد که معایب روش تشکیل کلونی را ندارد معرفی شده است. در یک مطالعه آزمون MTT به‌عنوان روشی مناسب برای تعیین حساسیت پرتوی رده سلولی که بازدهی پلیتینگ پایینی برای آزمون تشکیل کولونی دارد معرفی شده است.[۲۹-۳۱] با توجه به موارد فوق در این مطالعه نیز از روش MTT جهت بررسی میزان بقا استفاده گردید.

بر مبنای نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه DHA به‌عنوان یک اسید چرب امگا-۳ در شرایط In vitro با یک روند وابسته به غلظت قادر به حساس‌کردن سلول‌های سرطانی کولورکتال HT-29 نسبت به پرتو است. تیمار دو جانبه سلول‌ها با DHA و پرتو سبب اثر هم‌افزایی در میزان مرگ سلولی گردید. استفاده از دوز ۱۰ گری پرتو به‌همراه غلظت ۱۰۰ µM DHA، بهترین نتیجه را فراهم نمود. با توجه به هزینه‌های بالای درمان سرطان، همچنین اثرات زیان بار پرتو بر بافت‌های سالم و کل بدن، به‌کارگیری این ماده طبیعی، ارزان و در دسترس، ضمن درمان موثر، سبب کاهش پرتوگیری بیمار می‌گردد. بنابراین برای بسط دادن هرچه بیشتر این اثرکرد و انجام آزمایشاتی جهت پیگیری مکانیسم آن، مطالعات In vivo می‌تواند راه را برای کاربرد بالینی این ماده جهت کمک به درمان مؤثر و کارامد سرطان هموار سازد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی‌از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی حساسیت پرتوی سلول‌های سرطانی کولورکتال پس‌از تابش پرتو گاما و تیمار با دوکوزاهگزانویک اسید به‌دست‌آمده از روغن ماهی" در مقطع کارشناسی ارشد رادیوبیولوژی و حفاظت پرتوی در سال ۱۳۹۱ می‌باشد که با حمایت پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

References

1. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 2004;4(9):737-47.
2. Lawrence TS, Ten Haken RK, Giaccia A. Principles of radiation oncology. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 8th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2008.
3. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(8):1893-907.
4. Jobe BA, Hunter JG. Minimally invasive surgery: In: Brunicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pol-lock RE, editors. Schwartz's Principles of Surgery. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2005. p. 386-7, 1089-95.
5. Jalili SA, Kordjazi I, Jalali SM. Epidemiological characteristics of colorectal cancer in patients referred to Imam Khomeini Hospital during (1981-2001). *RJMS* 2004;11(43):723-9.
6. Andre N, Schmiegel W. Chemoradiotherapy for colorectal cancer. *Gut* 2005;54(8):1194-202.
7. Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Köhne CH, Pozzo C, Poston G, et al. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer* 2006;42(14):2212-21.
8. Hall MN, Chavarro JE, Lee IM, Willett WC, Ma J. A 22-year prospective study of fish, n-3 fatty acid intake, and colorectal cancer risk in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(5):1136-43.
9. Kato I, Akhmedkhanov A, Koenig K, Toniolo PG, Shore RE, Riboli E. Prospective study of diet and female colorectal cancer: the New York University Women's Health Study. *Nutr Cancer* 1997;28 (3):276-81.
10. Aronson WJ, Kobayashi N, Barnard RJ, Henning S, Huang M, Jardack PM, et al. Phase II prospective randomized trial of a low-fat diet with fish oil supplementation in men undergoing radical prostatectomy. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4(12):2062-71.
11. Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, Le Floch O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* 2009;101(12):1978-85.
12. Read JA, Beale PJ, Volker DH, Smith N, Childs A, Clarke SJ. Nutrition intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. *Support Care Cancer* 2007;15(3):301-7.
13. Cohen LA, Thompson DO, Maeura Y, Choi K, Blank ME, Rose DP. Dietary fat and mammary cancer. I. Promoting effects of different dietary fats on N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 1986;77(1):33-42.
14. Cohen LA, Chen-Backlund JY, Sepkovic DW, Sugie S. Effect of varying proportions of dietary menhaden and corn oil on experimental rat mammary tumor promotion. *Lipids* 1993;28(5):449-56.
15. Karmali RA, Marsh J, Fuchs C. Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J Natl Cancer Inst* 1984;73(2): 457-61.
16. Karmali RA, Reichel P, Cohen LA, Terano T, Hirai A, Tamura Y, et al. The effects of dietary omega-3 fatty acids on the DU-145 transplantable human prostatic tumor. *Anticancer Res* 1987;7(6): 1173-9.
17. Burns CP, North JA. Adriamycin transport and sensitivity in fatty acid-modified leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1986;888(1): 10-7.
18. Zijlstra JG, de Vries EG, Muskiet FA, Martini IA, Timmer-Bosscha H, Mulder NH. Influence of docosahexaenoic acid in vitro on intracellular adriamycin concentration in lymphocytes and human adriamycin-sensitive and -resistant small-cell lung cancer cell lines, and

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:38 IRDT on Saturday July 29th 2017

on cytotoxicity in the tumor cell lines. *Int J Cancer* 1987;40(6): 850-6.

19. Shao Y, Pardini L, Pardini RS. Dietary menhaden oil enhances mitomycin C antitumor activity toward human mammary carcinoma MX-1. *Lipids* 1995;30(11):1035-45.
20. Calviello Calviello G1, Di Nicuolo F, Serini S, Piccioni E, Boninsegna A, Maggiano N, et al. Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55(1):12-20.
21. Narayanan NK, Narayanan BA, Reddy BS. A combination of docosahexaenoic acid and celecoxib prevents prostate cancer cell growth in vitro and is associated with modulation of nuclear factor-kappaB, and steroid hormone receptors. *Int J Oncol* 2005;26(3):785-92.
22. Swamy MV, Cooma I, Patlolla JM, Simi B, Reddy BS, Rao CV. Modulation of cyclooxygenase-2 activities by the combined action of celecoxib and decosahexaenoic acid: novel strategies for colon cancer prevention and treatment. *Mol Cancer Ther* 2004;3(2):215-21.
23. Colas S, Paon L, Denis F, Prat M, Louisot P, Hoinard C, et al. Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer* 2004;109(3):449-54.
24. Zand H, Rahimipour A, Salimi S, Shafiee SM. Docosahexaenoic acid sensitizes Ramos cells to Gamma-irradiation-induced apoptosis through involvement of PPAR-gamma activation and NF-kappaB suppression. *Mol Cell Biochem* 2008;317(1-2):113-20.
25. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994 ;65(1):27-33.
26. Wen B1, Deutsch E, Opolon P, Auperin A, Frascogna V, Connault E, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids decrease mucosal/epidermal reactions and enhance antitumour effect of ionising radiation with inhibition of tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 2003;89(6):1102-7.
27. Kikawa KD1, Herrick JS, Tateo RE, Mouradian M, Tay JS, Pardini RS. Induced oxidative stress and cell death in the A549 lung adenocarcinoma cell line by ionizing radiation is enhanced by supplementation with docosahexaenoic acid. *Nutr Cancer* 2010;62(8): 1017-24.
28. Hoffman RM. In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. *J Clin Lab Anal* 1991;5(2):133-43.
29. Barnetson AR, Banasiak D, Fisher RJ, Mameghan H, Ribeiro JC, Brown K, et al. Heterogeneity of in vitro radiosensitivity in human bladder cancer cells. *Radiat Oncol Investig* 1999;7(2):66-76.
30. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47 (4):936-42.
31. Wasserman TH, Twentyman P. Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15(3):699-702.

TUMJ Tehran University Medical Journal, June 2014; Vol. 72, No. 3: 139-146 Original Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:38 IRDT on Saturday July 29th 2017

Radiosensitivity of radioresistant colorectal cancer cells after treatment with docosahexaenoic acid and irradiation

Farideh Hosseini M.Sc.[1]
Mohammad Reza Sam Ph.D.[2,3*]
Nasrollah Jabbari Ph.D.[4]

1- Department of Radiology, Faculty of Para Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Department of Histology and Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.
4- Department of Medical Imaging, Faculty of Para Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

[*] Corresponding author: Shahid Beheshti St., Urmia University, Institute of Biotechnology, Urmia, Iran.
Tel: +98-441-3440199
E-mail: s_mohammadreza@yahoo.com

Abstract

Received: 08 Dec. 2013 Accepted: 01 Mar. 2014 Available online: 05 May. 2014

Background: Radiotherapy has been used to treat many types of cancers over the past years. Radiotherapy generates side effects on normal tissues. Radiosensitizer products provide decrease in tumor proliferation and reduce radiation dose in radiotherapy. Docosahexaenoic Acid (DHA) as an omega-3 polyunsaturated fatty acid has anti-proliferative effects on malignant cells. In this study, the effects of DHA accompanied by ionizing radiation on growth rate and survival fraction of HT29 colorectal cancer cells were evaluated.

Methods: The present study was performed at the Institute of Biotechnology, affiliated to Urmia University, Urmia, Iran in the year 2013. In this laboratory experiment, malignant cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum. HT-29 cells were cultured at 5×10^5 cells/well into 6-well culture plates for overnight. Thereafter, the cells were pretreated with either 50 or 100 µM DHA for 4 hours and malignant cells were irradiated with either dose of 2 or 10 Gy. Cell viability was evaluated by trypan blue staining after 48 hours. Moreover, malignant cells were pretreated with either 50 or 100 µM DHA for 48 hours and irradiated with dose of 2 to 10 Gy. Thereafter, survival rate was evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay after 6 days.

Results: Cell viabilities were found to be 59.8% and 17.5% for 50 µM DHA in combination with doses of 2 and 10 Gy respectively. Using 100 µM DHA diminished cell viability up to 47% and 13.9% following doses of 2 and 10 Gy respectively. Treatment of cells with DHA accompanied by increasing doses of γ-rays significantly diminished survival rate. In treated cells with 50 and 100 µM DHA, survival rate were measured to be 79.1%, 57.6%, 42.8%, 40.5%, 34% and 55.8%, 43.7%, 33.6%, 27.9%, 23.5% for doses of 2, 4, 6, 8 and 10 Gy respectively.

Conclusion: Our study indicates that DHA decreases colorectal cancer cells proliferation and could provide a new radiosensitizer drug to enhance the efficacy of colorectal cancer radiotherapy.

Keywords: colorectal neoplasms, docosahexaenoic acids, fatty acids, gamma rays, HT29 cells, radiotherapy, unsaturated.