

اثرات کریسین در ترکیب با ۵-فلورواوراسیل بر سرطان کولون القاشده با آزوکسیمتان در موش

صدیقه یوسفی^۱ (M.Sc)، عباس پاکدل^{۱،۲} (Ph.D)، حمیدرضا ثامن^۲ (Ph.D)، وحید سمنانی^۳ (M.D)، نسرین خان محمدی^۴ (M.Sc)، احمدرضا بندگی^۵ (Ph.D)

- ۱- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
- ۳- مرکز توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان کوثر، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
- ۴- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
- ۵- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

چکیده

هدف: شیمی‌درمانی یکی از روش‌های درمانی سرطان کولون می‌باشد. ۵-فلورواوراسیل (5-Fluorouracil, 5-FU) به مدت چندین دهه است که به عنوان داروی مرسوم سرطان کولون مورد استفاده قرار می‌گیرد. کریسین یک فلاونوئید طبیعی است و در مطالعات *in vivo* و *in vitro* رشد سرطان را، بدون ایجاد هر گونه سمیت و عوارض جانبی نامطلوب بر سلول‌های طبیعی مهار کرده است. این مطالعه جهت ارزیابی اثرات کریسین در ترکیب با ۵-FU بر روی موش‌های سرطانی شده با آزوکسیمتان (Azoxymethane, AOM) طراحی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۴۲ سر موش سوری Balb/C نر بالغ با وزن ۱۸-۱۵ گرم به طور تصادفی به ۷ گروه، تقسیم شدند: (۱) گروه کنترل سالم، (۲) گروه کنترل سرطانی، (۳) گروه ۵-FU، (۴) گروه کریسین (Chrysin) با دوز ۵۰ mg/kg، (۵) گروه کریسین با دوز ۱۰۰ mg/kg، (۶) گروه کریسین با دوز ۵۰ mg/kg و ۵-FU، (۷) گروه کریسین با دوز ۱۰۰ mg/kg و ۵-FU در گروه ۲ تا ۷ با تزریق داخل صفاقی ۱۰ mg/kg آزوکسیمتان (AOM) و دکستران‌سدیم سولفات، (DSS-Dextran sodium sulfate) ۱/۵٪ در آب آشامیدنی، سرطان کولون ایجاد شد. درمان با کریسین در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ mg/kg و ۵-FU به صورت داخل صفاقی انجام شد. بعد از کشتن موش‌ها بررسی هیستوپاتولوژی (شامل: هایپرپلازی، دیسپلازی، کارسینوما و تعداد کانون کریپت‌های نابجا، ACF) در ناحیه دیستال روده بزرگ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ضایعات پاتولوژیک (هایپرپلازی، دیسپلازی و کارسینوما) و تعداد کانون کریپت‌های نابجه‌جا (aberrant crypt foci ACF) در تمام گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل سرطانی کم‌تر بود ($p < 0.05$). مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که تعداد ACF با تعداد ضایعات پاتولوژیک متناسب است. تعداد ACF‌ها در گروه‌های درمان ترکیبی کریسین با ۵-FU نسبت به گروه‌های درمان شده با کریسین و ۵-FU به تنهایی، کاهش معناداری داشت ($p < 0.05$). نتیجه‌گیری: کریسین دارای اثر هم‌افزایی با ۵-FU در کاهش تعداد کریپت‌های نابجه‌جا می‌باشد. کریسین می‌تواند به عنوان یک عامل ضد سرطان در ترکیب با سایر داروهای ضد سرطان در دسترس مانند ۵-FU مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان کولون، آزوکسیمتان، کریسین، فلورواوراسیل، درمان ترکیبی

مقدمه

سرطان کولون (روده بزرگ) است [۱] که سومین سرطان شایع و سومین علت عمده مرگ ناشی از سرطان در مردان و زنان می‌باشد [۲]. در ایران، سرطان روده بزرگ پنجمین سرطان

امروزه سرطان یکی از معضلات مهم و اساسی بهداشت و درمان در سراسر جهان می‌باشد. یکی از سرطان‌های شایع،

ضد حساسیت، ضد دیابت، ضد استروژنی، آنتی‌باکتریایی و آنتی‌توموری آن شناخته شده است. هم‌چنین کریسین رشد سرطان را از طریق القای آپوپتوز، تغییر چرخه سلولی، مهار رگ‌زایی، تهاجم و متاستاز، بدون ایجاد هر گونه سمیت و عوارض جانبی نامطلوب به سلول‌های طبیعی مهار می‌کند [۱۶، ۱۵]. مطالعه وو و همکاران بر روی رده سلولی U937 نشان داد که کریسین باعث القای آپوپتوز می‌شود و این نقش را از طریق فعال کردن کاسپاز ۳ - و مسیر سیگنالینگ AKT ایفا می‌کند [۱۷].

بسیاری از سرطان‌های کولون از طریق یک‌سری تغییرات هیستولوژیکی ایجاد می‌شوند، از جمله ظهور تغییر در اپیتلیال کولون که به همراه تغییرات ژنتیکی رخ می‌دهد. کریست‌های ناب‌جا (ACF) زخم‌های اولیه‌ای هستند که در سطح کولون رت‌هایی که با کارسینوم‌های مخصوص کولون مانند آزوکی متان سرطانی شده‌اند، تشخیص داده می‌شوند [۱۸]. ACF با تغییر در دهانه مجرا، ضخیم شدن سلول‌های اپی‌تلیال، بزرگ‌تر شدن کریست‌ها نسبت به کریست‌های نرمال مجاور تشخیص داده می‌شود [۱۹]. مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که افزایش تعداد ACF، نشان‌دهنده‌ی میزان پیشرفت سرطان کولورکتال می‌باشد [۲۰، ۱۸]. تا کنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای جهت بررسی اثر کریسین در ترکیب با ۵-FU بر روی سرطان کولون انجام نشده است، لذا در این مطالعه، اثرات درمانی ۵-FU در ترکیب با کریسین در مدل حیوانی سرطان کولون القا شده با آزوکی متان و دکستران سدیم سولفات ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه و مواد شیمیایی. تعداد ۴۲ سر موش سوری Balb/C نر بالغ با میانگین وزنی ۱۸-۱۵ گرم از انستیتو پاستور کرج خریداری شدند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی ۴۵-۵۵٪ و دسترسی کافی و آزاد به آب و غذا در مرکز

شایع در مردان و سومین سرطان شایع در زنان است [۴، ۳]. جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی به عنوان روش‌های مرسوم درمان سرطان است که هر کدام شامل معایب متعدد و عوارض جانبی هستند. از این‌رو توسعه‌ی این شیوه‌های درمانی با حداقل عوارض جانبی، ضروری است. گزینه‌های درمانی سرطان کولون به مرحله‌ی بیماری، وضعیت عمل‌کرد بیمار و به آرایش مولکولی تومور بستگی دارد [۵]. تا اواسط ۱۹۹۰ میلادی تنها داروی در دسترس (آن‌هم با فعالیت محدود) برای درمان سرطان کولورکتال متاستاتیک (Metastatic Colorectal Cancer, MCRC)، داروی 5-fluorouracil بود. معرفی دو داروی جدید سیتوتوکسیک Oxaliplatin و Irinotecan همراه با استفاده از 5-FU سبب پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در درمان MCRC شده است [۶-۸]. 5-FU به مدت چند دهه است که به عنوان داروی مرسوم سرطان کولون مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال سمیت این ماده به بافت‌های سالم یک مانع بزرگ برای شیمی‌درمانی موفق سرطان محسوب می‌گردد. لذا به منظور کاهش سمیت، استفاده از درمان ترکیبی 5-FU با مواد استخراج شده از گیاهان که دارای حداقل سمیت می‌باشند مانند جنستین و ژرانیول، باعث افزایش کارایی 5-FU شده است [۹]. با وجود پیشرفت مداوم داروهای ضد تومور و عوامل درمانی، اما هم‌چنان برای کاهش دادن سمیت 5-FU، از ترکیب آن با Leucoverin به عنوان یک درمان اساسی استفاده می‌کنند [۱۰] در حال حاضر محققین جهت بهبود روش‌های درمانی، مواد شیمیایی گیاهی را مورد مطالعه قرار می‌دهند [۱۱]. یکی از این ترکیبات، فلاونوئیدها (متابولیت‌های ثانویه گیاهان) هستند، که دارای اثرات بیولوژیکی مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ضد التهابی و ضد سرطانی می‌باشند [۱۲]. کریسین (۵ و ۷ دی‌هیدروکسی فلاون)، یکی از این فلاونوئیدهای طبیعی است. این ترکیب یک مهارکننده‌ی قوی سیتوکروم P450A1 [13] و آروماتاز [۱۴] می‌باشد که در گیاهان، عسل و بره موم (پروپولیس) وجود دارد. در مطالعات *in vivo* و *in vitro*، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی،

تولوئیدن بلو ۱/۰٪ به مدت ۲ دقیقه رنگ آمیزی شده و در محلول بافر فسفات با $\text{pH} = 7/2$ شسته شد.

به منظور تشخیص و بررسی کمی کریپت‌های نابه‌جا در سطح مخاط روده از استریومیکروسکوپ با بزرگ‌نمایی $\times 60$ استفاده گردید. به این ترتیب که در طول کولون‌کانون‌های کریپت‌های نابه‌جا شناسایی شده و سپس به صورت زیر طبقه‌بندی شدند.

رتبه ۱ (کانونی با یک کریپت نابه‌جا)، رتبه ۲ (کانونی با ۲ تا ۳ کریپت نابه‌جا)، رتبه ۳ (کانونی با ۴ تا ۱۰ کریپت نابه‌جا) و رتبه ۴ (کانونی با بیش از ۱۰ کریپت نابه‌جا) [۲۳].

هیستوپاتولوژی: از قسمت دیستال روده بزرگ هر موش ۵ برش سریال با ضخامت ۳-۴ میکرون تهیه و با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شد. برش‌ها با میکروسکوپ Zeiss آلمان و با بزرگ‌نمایی $\times 100$ و $\times 400$ از نظر پارامترهای زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

- ۱- هیپرپلازی (افزایش رنگ‌پذیری- وجود هستک و بزرگی هسته در $2/3$ تحتانی کریپت) در ضمن orifice خروجی کریپت برجسته و میزان موسین کاهش می‌یابد.
- ۲- دیسپلازی (افزایش نسبت هسته به سیتوپلاسم، هیپرکرومازی و غشای نامنظم هسته) در سه درجه خفیف، متوسط و شدید.
- ۳- کارسینوما [۲۶].

آنالیز آماری: در این تحقیق داده‌های حاصل در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و آزمون تکمیلی Tucky توسط نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر 5-FU، کریسین و ترکیب این دو بر تشکیل کریپت‌های نابه‌جا. رتبه‌بندی‌ها بر اساس تعداد کریپت‌های

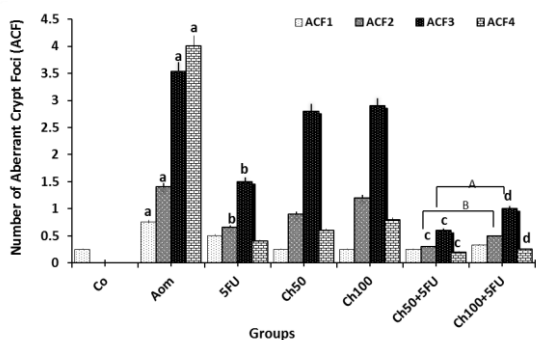
تحقیقات فیزیولوژی نگهداری شدند. تمام مراحل مطابق آئین‌نامه کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه انجام شد.

DSS، AOM و کریسین (وزن مولکولی ۲۴/۲۵۴) از شرکت سیگما و 5-FU از شرکت EBEWE اتریش خریداری شد. کریسین در ابتدا در بافر تریس با $\text{pH} = 9$ حل گردید و سپس با ۱ N HCl، pH آن به $7/2$ رسید [۲۱].

گروه‌های مورد مطالعه: حیوانات پس از یک هفته جهت سازگاری با محیط به طور تصادفی به هفت گروه تقسیم شدند. گروه اول موش‌های سالم (کنترل منفی) و گروه‌های ۲ تا ۷ سرطانی شدند. ۱- گروه کنترل سالم ۲- گروه کنترل سرطانی (تزریق AOM و DSS)، ۳- گروه 5-FU، ۴- گروه کریسین با دوز 50 mg/kg ، ۵- گروه کریسین با دوز 100 mg/kg ، ۶- گروه کریسین با دوز 50 mg/kg و 5-FU، ۷- گروه کریسین با دوز 100 mg/kg و 5-FU.

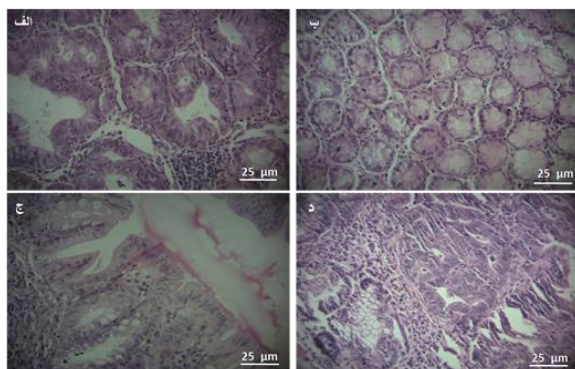
در گروه‌های ۲ تا ۷ با تزریق داخل صفاقی AOM (10 mg/kg) (یک‌بار) و ($1/5\%$) DSS در آب آشامیدنی، یک هفته بعد از تزریق AOM و به مدت یک هفته، سرطان کولون ایجاد شد [۲۲]. درمان با کریسین در دوزهای 50 mg/kg و 100 mg/kg به صورت داخل صفاقی هم‌زمان با تزریق AOM شروع و به مدت ۸ هفته (۵ بار در هفته) ادامه داشت. درمان با 5-FU (50 mg/kg) هم‌زمان با AOM شروع و هفته‌ای یک‌بار به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۲۳، ۲۴، ۲۵].

بررسی ACF بعد از کشتن حیوان با اتر، شکم حیوان باز شده و روده‌ها به طور کامل خارج گردید. سپس کولون به صورت طولی باز شده و با نرمال سالین $0/9\%$ شستشو داده شد. روده به سه قطعه شامل کولون پروگزیمال، کولون میانی و کولون دیستال (همراه با رکتوم) تقسیم گشت. قسمت دیستال به ۲ قسمت تقسیم شده و قسمتی جهت کارهای هیستوپاتولوژی در فرمالین 10% فیکس و سپس برای انجام برش در بلوک‌های پارافین قالب‌گیری گردید. قسمت دیگری جهت بررسی ACF، پس از قرار دادن بر روی اسلاید با روش



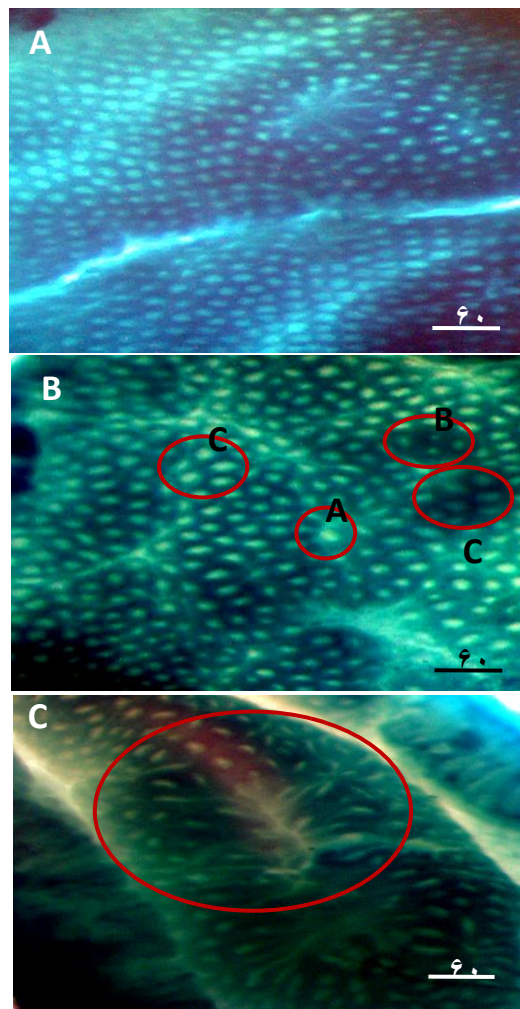
شکل ۲. اثر 5-FU، کریسین ۵۰، کریسین ۱۰۰ و ترکیب کریسین ۵۰ و ۱۰۰ با 5-FU بر میزان تشکیل کانون کریپت های نابجا (ACF). سطح معنی داری $p < 0.05$. a. اختلاف معنی دار بین گروه AOM و گروه های دیگر، b. اختلاف معنی دار بین گروه 5-FU با گروه Ch100، c. اختلاف معنی دار بین گروه Ch50+5-FU با گروه های 5-FU، d. اختلاف معنی دار بین گروه Ch100+5FU با گروه های Ch100 و Ch50، A و B اختلاف معنی دار در کریپت های با رتبه ۲ و ۳ بین گروه های Ch50+5-FU و Ch100+5FU

اثر 5-FU، کریسین و ترکیب این دو بر شاخص های هیستوپاتولوژی. برش های سریالی پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین از نظر ضایعات هیپرپلازی، دیسپلازی و کارسینوما بررسی شد (شکل ۳) و همان طور که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، گروه AOM (کنترل سرطانی) دارای حداکثر ضایعات (۷۶/۶۶٪) نسبت به سایر گروه های درمان شده می باشد و در بین گروه های درمانی، گروه 5-FU + ۵۰Ch، کمترین (۱۰٪) میزان ضایعه را نشان داد. هم چنین تعداد کل ضایعات در گروه ۵۰Ch کم تر از گروه ۱۰۰Ch بود، ولی در گروه 5-FU نسبت به گروه های ۵۰Ch و ۱۰۰Ch تعداد کل ضایعات کم تری مشاهده شد. تعداد ضایعات پاتولوژیک در گروه های 5-FU + ۵۰Ch و 5-FU + ۱۰۰Ch نسبت به گروه 5-FU کم تر بود.



شکل ۳. برش های سریالی ناحیه دیستال کولون پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، و بزرگنمایی ۴۰۰× (الف) نرمال، (ب) هیپرپلازی، (ج) دیسپلازی، (د) کارسینوما. ۲۵ میکرومتر = scale bar

نابجا در هر کانون انجام گردید (شکل ۱). تغییرات تعداد ACF ها در گروه های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. آزمون آماری نشان داد که تعداد ACF ها در گروه AOM بیش تر از سایر گروه ها می باشد ($p < 0.05$). تعداد ACF ها در گروه 5-FU کم تر از گروه Ch ۱۰۰ بود ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که تعداد ACF ها در گروه 5-FU + ۵۰Ch در مقایسه با گروه های ۵۰Ch، ۱۰۰Ch و 5-FU کاهش معناداری دارد ($p < 0.05$). در گروه 5-FU + ۱۰۰Ch در مقایسه با گروه های 5-FU، ۵۰Ch و ۱۰۰Ch تعداد ACF کم تری مشاهده شد ($p < 0.05$). هم چنین تعداد ACF ها با رتبه ۲ و ۳ در گروه 5-FU + ۵۰Ch نسبت به گروه 5-FU + ۱۰۰Ch کم تر بود ($p < 0.05$).



شکل ۱. کانون های کریپت های نابجا (ACF) با رتبه های مختلف در مقاطع طولی ناحیه دیستال رنگ آمیزی شده با تولوئیدین بلو (بزرگنمایی ۶۰×). الف: نرمال، ب: کانون کریپت های نابجا با رتبه های ۱، ۲ و ۳ که به ترتیب با A، B و C مشخص شده است، ج: کانون کریپت های نابجا با رتبه ۴. ۶۰ میکرومتر = scale bar

جدول ۱. اثر 5-FU، کریسین ۵۰، کریسین ۱۰۰ و ترکیب کریسین ۵۰ و ۱۰۰ با 5-FU بر شاخص های هیستوپاتولوژی بافت کولون

| Animal Groups | Total No. of Samples | Total Lesions No. / % | Normal No. / % | Hyperplasia No. / % | Dysplasia No. / % | Carcinoma No. / % | Lesion Burden |
|---------------|----------------------|-----------------------|----------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| Con | ۳۰ | ۰/۰ | ۳۰/۱۰۰ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۰ |
| AOM | ۳۰ | ۲۳/۷۶,۶۶ | ۷/۲۳,۳۳ | ۵/۱۶,۶۶ | ۱۲/۴۰ | ۶/۲۰ | ۳,۸ |
| 5FU | ۳۰ | ۷/۲۳,۳۳ | ۲۳/۷۶,۶۶ | ۷/۲۳,۳۳ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۱,۱۷ |
| Ch50 | ۳۰ | ۸/۲۶,۶۶ | ۲۲/۷۳,۳۳ | ۸/۲۶,۶۶ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۱,۳۳ |
| Ch100 | ۳۰ | ۱۲/۴۰,۰ | ۱۸/۶۰,۰ | ۶/۲۰,۰ | ۳/۱۰,۰ | ۳/۱۰,۰ | ۲,۰ |
| Ch50+5FU | ۳۰ | ۳/۱۰,۰ | ۲۷/۹۰,۰ | ۳/۱۰,۰ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۰,۵ |
| Ch100+5FU | ۳۰ | ۵/۱۶,۶۶ | ۲۵/۸۳,۳۳ | ۲/۶,۶۶ | ۳/۱۰,۰ | ۰/۰ | ۰,۸۳ |

Total Lesions: تعداد و درصد کل موش هایی که ضایعه داشته اند. Lesion burden: نسبت تعداد و درصد کل ضایعه در هر گروه به تعداد کل موشها (تعداد موشها = ۶ سر). Normal: تعداد و درصد نمونه هایی که نسبت به کل نمونه ها وضعیت نرمال و سالم داشته اند. Hperplasia, Dysplasia and Carcinoma: تعداد و درصد نمونه هایی که ضایعات پاتولوژیک (هیپرپلازی، دیس پلازی و کارسینوما) نسبت به کل نمونه ها داشته اند.

بحث و نتیجه گیری

استفاده از داروهای سنتتیک جهت شیمی درمانی سرطانها دارای اثرات جانبی نیز می باشد. لذا استفاده از ترکیبات گیاهی به تنهایی و یا به صورت ترکیب با داروهای شیمیایی می تواند باعث کاهش اثرات مضر این داروها در درمان سرطانها باشد. این مطالعه با هدف تعیین اثرات ضد توموری کریسین در ترکیب با 5-FU بر روی موش های سرطانی شده توسط آزوکسی متان دکستران سدیم سولفات انجام شد. آزوکسی متان در بدن، ابتدا توسط سیتوکروم P450 به ویژه آنزیم CYP2E1 متابولیزه شده و در نهایت به یک ترکیب بسیار فعال آلکیل کننده به نام متیل دی آزونیم تبدیل می شود. متیل دی آزونیم منجر به الکیل شدن گوانین ها در DNA شده، که این جهش ها از طریق چندین سیگنال داخل سلولی، شامل K-ras، بتا-کاتین و TGFβ با کاهش آپوپتوز و افزایش سیکل سلولی باعث ایجاد سرطان کولون می شود [۲۷]. DSS با آسیب رساندن به سد اپیتلیال روده باعث التهاب می گردد، از طرفی، التهاب به همراه تولید گونه های فعال اکسیژن و کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی به سرطانی شدن کولون کمک می کند [۲۸]. همان طور که در مقدمه ذکر گردید، بررسی ACF یک گام جهت شناسایی پیشرفت سرطان کولون می باشد. از این رو در این مطالعه تغییرات ACF و ضایعات هیستوپاتولوژی به دنبال تجویز کریسین به تنهایی و همراه با داروی 5-FU بررسی شد. افزایش تعداد ACFها و مشاهده ضایعات

هیپرپلازی، دیسپلازی و کارسینوما در گروه کنترل سرطانی تاییدی بر ایجاد سرطان کولون بود. کاهش تعداد ACFها در همه گروه های درمانی نسبت به گروه AOM نشان دهنده اثرات کریسین در مهار شروع و پیشرفت سرطان کولورکتال است که مشابه مطالعه Priscilla و همکاران در بررسی اثر مهاری کریسین به دنبال تزریق کریسین در رت های سرطانی شده با ۱ و ۲ دی متیل هیدرازین بود [۲۳].

تعداد ACFها در گروه ۵-FU نسبت به گروه های درمان شده با ۵۰Ch و ۱۰۰Ch کاهش معناداری داشت، به عبارتی درمان با 5-FU به تنهایی موثرتر از کریسین با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ به تنهایی بود. مقایسه دو گروه درمانی ۵۰Ch و ۱۰۰Ch با یکدیگر نشان داد که در گروه ۵۰Ch، تعداد ACFها نسبت به گروه ۱۰۰Ch، کم تر بود، که البته اختلاف معنی دار نبود. هم چنین ترکیب ۵۰Ch و ۱۰۰Ch با 5-FU نسبت به دو گروه درمانی ۵۰Ch و ۱۰۰Ch، اثر هم افزایی را با کاهش معنادار ACF نشان دادند، به طوری که کریسین با دوز ۵۰ دارای اثر هم افزایی بیش تری نسبت به کریسین ۱۰۰ با 5-FU داشت. می توان فرض کرد که کریسین در این دوزها موجب افزایش اثر شیمی درمانی 5-FU شده است، که از این نظر، همانند اثرات کورکومین و هگزاکورکومین در ترکیب با 5-FU می باشد [۹] و هم چنین مشابه اثر Weichang'an در ترکیب با 5-FU است [۲۹].

روی سرطان‌های پوست، کلیه و سینه نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است که به ترتیب سبب تضعیف سیگنالینگ MSK1/histone H3 [۳۴]، بهبود در تکثیر، استرس اکسیداتیو و التهاب از طریق مسیر NF-kB [۳۵] و مهار فعالیت آنزیمی HDAC8 [۳۶] شده است.

بررسی مطالعات متعددی که بر روی کریسین انجام شده و نتایج مطالعه کنونی نشان‌دهنده وجود مکانیسم‌های متنوع فعالیت مولکولی کریسین، شامل ترکیبی از مسیرهای سیگنالینگ سلولی در سطوح مختلف از تومورژنیز می‌باشد. با مشکلات جاری مقاومت دارویی، سمیت و هزینه درمان بالا در ارتباط با داروهای ضد سرطان، توجه به ترکیبات استخراج شده از گیاهان، مانند کریسین می‌تواند به عنوان یک عامل ضد سرطان به تنهایی یا در ترکیب با سایر داروهای ضد سرطان در دسترس مانند 5-FU مفید باشد. مزیت کریسین علاوه بر اثربخشی بالا، هزینه کم آن نیز می‌باشد.

با این‌که اثرات کریسین در سرطان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و به اثبات رسیده است، ولی اثر هم‌افزایی آن با داروهای شیمی‌درمانی رایج تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته بود و در این مطالعه کریسین در هر ۲ دوز ۵۰ و ۱۰۰ اثر هم‌افزایی خود را نسبت به 5-FU به تنهایی نشان داد.

سرطان کولون یک بیماری پیش‌رونده است و شبیه‌سازی آن در حیوانات کامل نیست و به راحتی انجام نمی‌شود و نتایج حاصل از آن‌ها را نمی‌توان به طور مستقیم به نمونه‌های سرطان کولون در انسان تعمیم داد. با توجه به محدودیت زمان، در این مطالعه، فقط فاز حاد سرطان کولون مورد بررسی قرار گرفت، در صورتی‌که در زمان بیش‌تر، فاز مزمن نیز می‌تواند مورد بررسی قرار بگیرد. از دیگر محدودیت‌های این مطالعه، تعداد گروه‌های درمانی بود که فقط در دوز کریسین ۵۰ و ۱۰۰ بررسی شد. هم‌چنین در این مطالعه اثر هم‌افزایی کریسین در ترکیب با یک دوز ثابت 5-FU مورد بررسی قرار گرفت که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده کریسین با

نتایج بررسی ضایعات هیستوپاتولوژی در این مطالعه نیز نشان داد که تعداد این ضایعات در تمام گروه‌های درمانی کم‌تر از گروه کنترل سرطانی است. اثر وابسته به دوز کریسین در کاهش دادن تعداد کل ضایعات پاتولوژیک، همانند اثر آن در کاهش تعداد ACF‌ها بود، به طوری که اثر کریسین در کاهش دادن تعداد ضایعات با دوز ۵۰ به تنهایی و یا به صورت ترکیب با 5-FU، به ترتیب موثرتر از کریسین با دوز ۱۰۰ و یا ترکیب با 5-FU بود. مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که تعداد ACF‌ها متناسب با تعداد ضایعات پاتولوژیک می‌باشد.

سرطان با تبدیل سلول‌های نرمال به سلول‌های سرطانی آغاز می‌شود که این سلول‌های سرطانی با پیشرفت تومور تبدیل به سلول‌های پرتوپلاستیک می‌شوند و در ادامه با پیشرفت سرطان، تبدیل به سلول‌های تئوپلاستیک می‌گردد. کریسین با مهار فعال‌سازی متابولیکی پروکاریسینوزن‌ها و با تحریک سم‌زدایی کارسینوزن‌ها سبب مهار پیشرفت سرطان از طریق توقف رشد و آپوپتوز، مهار التهاب پیش‌برنده تکثیر سلولی، رگ‌زایی، مهاجم و متاستاز می‌شود [۱۵].

نتایج مطالعه Miyamoto برای بررسی اثر کریسین بر روی سرطان کولون، نشان داد که کریسین با کاهش PCNA و فاکتورهای شبه لپتین و IGF-1 سبب مهار فعالیت تکثیر سلولی می‌شود [۲۴]. در مطالعه‌ی دیگری که برای بررسی اثر کریسین بر روی سرطان کولون توسط Sequetto و همکاران انجام شد، کریسین با مهار تکثیر سلولی، بازایی سطوح آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو اثر خود را نشان داد [۲۳].

کریسین بر روی سایر سرطان‌ها از جمله کبد با کاهش بیان بتا کاتین، کاهش التهاب از طریق کاهش بیان COX-2، p65 و NF-kB، القای آپوپتوز به وسیله‌ی کاهش سطح Bcl-xL، b-arrestin p53، Bax caspase 3، تضعیف مسیر سیگنالینگ Wnt و NF-kB اثرات ضد سرطانی خود را نشان داده است [۳۰-۳۲]. کریسین، با مهار بیان HIF-1a و VEGF پیشرفت سرطان پروستات را کاهش داده است [۳۳]. اثرات کریسین بر

expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1205: 325-335.

[14] Sanderson JT, Hordijk J, Denison MS, Springsteel MF, Nantz MH, Van Den Berg M. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Sci* 2004; 82: 70-79.

[15] Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, V AK, Gogoi R, Barua CC. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicol Lett* 2015; 233: 214-225.

[16] Williams CA, Harborne JB, Newman M, Greenham J, Eagles J. Chrysin and other leaf exudate flavonoids in the genus *Pelargonium*. *Phytochemistry* 1997; 46: 1349-1353.

[17] Woo KJ, Jeong YJ, Park JW, Kwon TK. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1215-1222.

[18] Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 1995; 93: 55-71.

[19] Bird R, McLellan E, Bruce W. Aberrant crypts, putative precancerous lesions, in the study of the role of diet in the aetiology of colon cancer. *Cancer Surv* 1988; 8: 189-200.

[20] Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Human Pathol* 1991; 22: 287-294.

[21] Li XW, Wang XM, Li S, Yang JR. Effects of chrysin (5,7-dihydroxyflavone) on vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. *Chin Med* 2015; 10: 4.

[22] Miyoshi N, Nagasawa T, Mabuchi R, Yasui Y, Wakabayashi K, Tanaka T, Ohshima H. Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam sanyaku and its constituent diosgenin. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4: 924-934.

[23] Sequetto PL, Oliveira TT, Soares IA, Maldonado IR, Mello VJ, Pizziolo VR, et al. The flavonoid chrysin attenuates colorectal pathological remodeling reducing the number and severity of pre-neoplastic lesions in rats exposed to the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Cell Tissue Res* 2013; 352: 327-339.

[24] Miyamoto S, Yasui Y, Ohgashi H, Tanaka T, Murakami A. Dietary flavonoids suppress azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. *Chem Biol Interact* 2010; 183: 276-283.

[25] Kawase A, Matsumoto Y, Hadano M, Ishii Y, Iwaki M. Differential effects of chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics mediated by intestinal breast cancer resistance protein in rats and mice. *J Pharm Pharm Sci* 2009; 12: 150-163.

[26] Perse M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 473964.

[27] Chen J, Huang XF. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1313-1317.

[28] Mladenova D, Kohonen-Corish MR. Mouse models of inflammatory bowel disease-insights into the mechanisms of inflammation-associated colorectal cancer. *In Vivo* 2012; 26: 627-646.

[29] Tao L, Yang JK, Gu Y, Zhou X, Zhao AG, Zheng J, Zhu YJ. Weichang'an and 5-fluorouracil suppresses colorectal cancer in a mouse model. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 1125-1139.

دوزهای متفاوت 5-FU و علاوه بر فاز حاد، فاز مزمن سرطان کولورکتال نیز بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سمنان بابت حمایت‌های مالی از این طرح با شماره ۸۹۴، تشکر و قدردانی می‌شود. این مقاله، بخشی از پایان‌نامه خانم صدیقه یوسفی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی است.

منابع

- [1] Dolatkah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi Kermani I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: molecular epidemiology and screening strategies. *J Cancer Epidemiol* 2015; 2015: 643020.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30.
- [3] Mohammadianpanah M. Colorectal cancer incidence: does Iran follow the west? *Ann Colorectal Res* 2015; 3: e28045.
- [4] Safae A, Moghimi-Dehkordi B, Fatemi SR, Pourhoseingholi MA, Vahedi M, Pourhoseingholi A, Habibi M, Zali MR. Frequency of colorectal cancer in healthy individual's relatives: A cross-sectional population-based study. *Koomesh* 2011; 12: 129-133. (Persian).
- [5] Stintzing S. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 108.
- [6] Razavi S.M RM, Attarian H, Rafat J, Mortazavizadeh SM, Shirali A, Sharifipour E. Comparison of the effect of standard chemotherapy and its combination with Cetuximab on the survival of patients with progressive colon cancer. *Razi J Med Sci*. 2009; 16: 30-37..
- [7] Capdevila J, Saura C, Macarulla T, Casado E, Ramos FJ, Taberero J. Monoclonal antibodies in the treatment of advanced colorectal cancer. *Eur J Surgical Oncol (EJSO)* 2007; 33: S24-S34.
- [8] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345.
- [9] Srimuangwong K, Tocharus C, Tocharus J, Suksamrarn A, Chintana PY. Effects of hexahydrocurcumin in combination with 5-fluorouracil on dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 6951-6959.
- [10] Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll HJ, Tveit KM, Gibson F. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2015; 14: 1-10.
- [11] Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 830616.
- [12] Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacol* 1983; 32: 1141-1148.
- [13] Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV. Isozyme-and species-specific susceptibility of cDNA-

inhibiting its protein synthesis. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 220-226.

[34] Liu H, Hwang J, Li W, Choi TW, Liu K, Huang Z, et al. A derivative of chrysin suppresses two-stage skin carcinogenesis by inhibiting mitogen- and stress-activated kinase 1. *Cancer Prev Res* 2014; 7: 74-85.

[35] Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, Khan R, Lateef A, Qamar W, Ali F, Sultana S. Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: plausible role of NF- κ B. *Toxicol Lett* 2013; 216: 146-158.

[36] Sun LP, Chen AL, Hung HC, Chien YH, Huang JS, Huang CY, et al. Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 11748-11758.

[30] Quan MF, Xiao LH, Liu ZH, Guo H, Ren KQ, Liu F, Cao JG, Deng XY. 8-bromo-7-methoxychrysin inhibits properties of liver cancer stem cells via downregulation of β -catenin. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 7680.

[31] Khan MS, Devaraj H, Devaraj N. Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 251: 85-94.

[32] Khan MS, Halagowder D, Devaraj SN. Methylated chrysin induces co-ordinated attenuation of the canonical Wnt and NF- κ B signaling pathway and upregulates apoptotic gene expression in the early hepatocarcinogenesis rat model. *Chem Biol Interact* 2011; 193: 12-21.

[33] Fu B, Xue J, Li Z, Shi X, Jiang BH, Fang J. Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1 α through reducing hypoxia-inducible factor-1 α stability and

Effects of chrysin in combination with 5-fluorouracil on azoxymethane- induced colon cancer in mice

Sedighe Yosefi (M.Sc)¹, Abbas Pakdel (Ph.D)¹, Hamidreza Sameni (Ph.D)², Vahid Semnani (M.D)³, Nasrin Khanmohammadi (M.Sc)⁴, Ahmadreza Bandegi (Ph.D)^{*5}

1. Nervous System Stem Cells Research Center and Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2. Nervous System Stem Cells Research Center and Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

3. Dept. of Pathology, Kowsar Hospital, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

4. Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

5. Research Center of Physiology, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 11 Mar 2017; Accepted: 6 Sep 2017)

Introduction: Chemotherapy is one of the procedures in colon cancer treatment. 5-Fluorouracil (5-FU), a conventional drug for colon cancer treatment is used for several decades. Chrysin is a natural flavonoid that inhibits the growth of cancer cells. In vivo and also in vitro studies have showed that Chrysin does not have any toxic side effects on normal cells. This study was designed to evaluate the effects of Chrysin in combination with 5-FU on azoxymethane (AOM) - induced colon cancer in mice.

Materials and Methods: In this study 42 male balb/c mice weighing 15-18 g, were used. Mice were divided into seven groups: 1) Health control, 2) Cancer Control, 3) 5-FU, 4) Chrysin with dose of 50 mg/kg, 5) Chrysin with dose of 100 mg/kg, 6) Chrysin with dose of 50 mg/kg plus 5-FU, 7) Chrysin with dose of 100 mg/kg plus 5-FU. Colon cancer was induced by i.p. infusion of AOM (10mg/kg) and (Dextran sodium sulfate) DSS (1.5%) in the drinking water for one week. All rats were sacrificed for evaluation of histopathology (hyperplasia, dysplasia, carcinoma and the number of aberrant crypt foci ,ACF) in distal region of large intestine.

Results: Pathological lesions (hyperplasia, dysplasia and carcinoma) and the number of aberrant crypt foci (ACF) was lower in all treatment groups compared to the cancer control group ($p < 0.05$). Comparison between the groups showed that number of ACFs is proportionate to the number of pathological lesions. The number of ACF in the combination therapy groups had decreased significantly compared to the group's treated with chrysin or 5- FU ($p < 0.05$).

Conclusion: Chrysin has a synergistic effect with 5-FU in reducing the number of ACFs. Chrysin can be considered as an anti-cancer agent in combination with other anti-cancer drugs available, such as 5-FU.

Keywords: Colon Cancer, Azoxymethan, Chrysin, Fluorouracil, Combination Therapy.

* Corresponding author. Tel: +98 23 33354170
arbandegi@yahoo.ca