

مکانیسم بیوشیمی التهاب در سرطان کولورکتال

فائزه فاطمی*، ابوالفضل دادخواه*، مریم هنردوست**، سید مهدی ابراهیمی***، دکترمهدی هدایتی****

* گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

** گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

*** گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس

**** مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

تحریک کننده های بیولوژیکی و شیمیایی، موجب آسیب انواع مختلفی از بافت های بدن می شوند. بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیکی دلالت بر این نکته دارند که تحریک مزمن بافتی با خطر ابتلا به سرطان در عضو مربوطه، در ارتباط است. یکی از مهم ترین شاخص های تحریک مزمن بافتی، افزایش فعالیت مسیر متابولیسمی آراشیدونیک اسید و تولید بسیاری از واسطه های بیوشیمیایی التهاب می باشد. مسیر سیلکواکسیژناز (COX) از متابولیسم آراشیدونیک اسید منجر به تولید انواع مختلفی از پروستاگلاندین ها و ترمبوکسان ها می گردد. این عوامل التهابی، اثرات بیولوژیک خود را در بافت مربوطه اعمال و موجب پیشرفت سرطان های انسانی می گردند. امروزه، تعداد زیادی از داروهای سنتتیک و محصولات طبیعی نیز شناخته شده اند که از تولید این عوامل التهابی توسط آراشیدونیک اسید و در نتیجه ایجاد و پیشرفت سرطان جلوگیری می کنند. یکی از شناخته شده ترین داروها، داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) می باشد. در این مقاله، نقش عوامل التهابی دخیل در ایجاد سرطان کولورکتال و نیز مکانیسم مهار آن ها، به اختصار توضیح داده می شوند.

واژگان کلیدی: داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی- سرطان- سیلکواکسیژناز.

مقدمه

التهاب مزمن توسط عفونت های باکتریایی، ویروسی، انگلی، ذرات غیرقابل هضم، مواد شیمیایی و عوامل دیگر ایجاد شده و به طور مستقیم با فعال سازی سیستم ایمنی و نیز غیرمستقیم، با واسطه سیلکواکسیژناز-۲ (COX-2) در بروز بیماری های بدخیم دخالت می کند (شکل ۱) (۱).

همانطور که در شکل ۱ نیز نشان داده شده است، قرار گرفتن در معرض آنتی ژن به صورت مزمن موجب ایجاد یک سیکل متوالی شده که در آن سایتوکین های پیش التهابی و

سایتوکین های Th1 (T helper1) از جمله اینترلوکین - ۲ (IL-2)، اینترفرون گاما (IFN- γ)، فاکتور نکروز تومور α (TNF- α)، TNF- α القاء شده و موجب افزایش بیان COX-2 و نیز تولید مزمن سایتوکین های Th2 (T helper 2) مانند اینترلوکین - ۴ (IL-4)، اینترلوکین - ۶ (IL-6) و اینترلوکین - ۱۰ (IL-10) و در نتیجه کاهش عملکرد پاسخ ایمنی سلولی (CMI) می گردند (۱).

فرآیند التهاب مزمن، با افزایش در متابولیسم آراشیدونیک اسید (سوبسترای COX-2) شروع می شود. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که مسیر متابولیسم آراشیدونیک اسید (AA) (شکل ۲) و سنتز پروستاگلاندین ها (PGs)، با پیشرفت سرطان ارتباط داشته، بطوریکه پولیپ های بافت کولونی در اثر التهاب افزایش می یابند (۲).

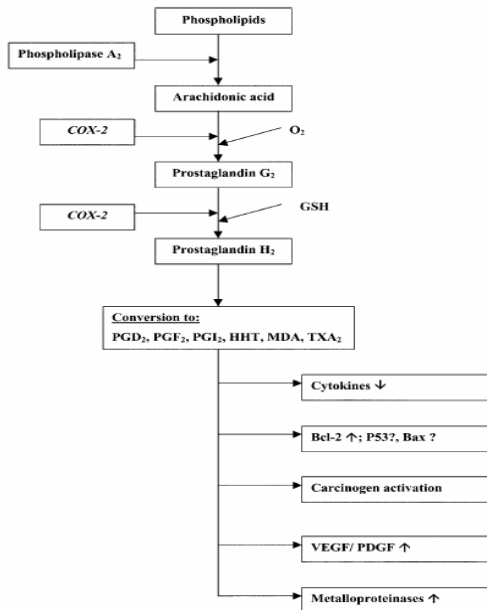
آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دکتر مهدی هدایتی (email: Hedayati@erc.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۱/۱۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۴/۱۹

نقش سیلکواکسیژناز - ۲ (COX-2) در ایجاد سرطان

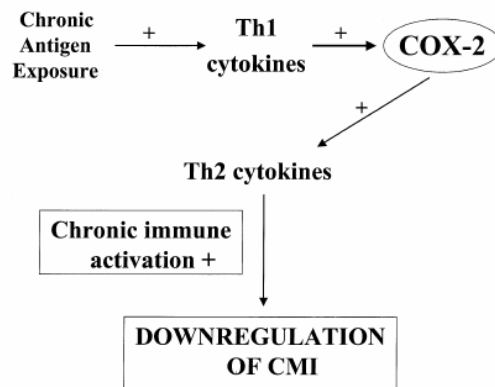
بیش از ۲۰ سال قبل، غلظت بالای پروستاگلاندین‌ها در بافت‌های توموری انسان و حیوان یافت شدند. از آن زمان به بعد، تحقیقات بسیاری در این زمینه صورت گرفت. نتایج نشان داد که داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs)، با مهار سنتز پروستاگلاندین و پروستاگوانیدها از آراشیدونیک اسید، خطر ابتلا به سرطان کولورکتال را کاهش می‌دهند (۶). آراشیدونیک اسید (AA) یک اسید چرب با چند باند غیراشباع بوده که توسط یک پیوند استری به موقعیت ۲ اکثر فسفولیپیدهای غشایی متصل می‌شود. مرحله اول در سنتز پروستاگلاندین‌ها (PGs)، هیدرولیز فسفولیپیدها و آزادسازی AA توسط فسفولیپاز A2 می‌باشد (شکل ۳). مرحله بعدی در این مسیر، توسط COX-2 یا COX-1، کاتالیز می‌شود که مولکول O2 را وارد ساختمان AA می‌کند. محصول این واکنش، پروستاگلاندین G2 (PGG2) می‌باشد که بسیار ناپایدار بوده و سریعاً توسط فعالیت پراکسیداز COX، تبدیل به پروستاگلاندین H2 (PGH2) می‌شود. PGH2، پیش‌ساز معمول تمام پروستاگوانیدها می‌باشد که هر کدام فعالیت بیولوژیکی خاص خود را انجام می‌دهند (۷).



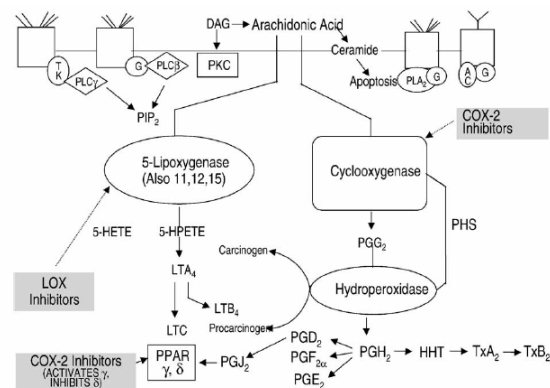
شکل ۳- مسیر بیوشیمیایی کاتالیز شده توسط COX-2
(۷).

همانطور که ذکر شد، آنزیمی که مرحله اول سنتز پروستاگلوئیدها از آراشیدونیک اسید (AA) را کاتالیز می‌کند، سیکلو‌اکسیژناز (COX)، پروستاگلاندین H سنتاز و یا

همانطور که در شکل نیز نشان داده شده است، هر دو مسیر اصلی [سیلکواکسیژناز (COX) و لیپواکسیژناز (LOX)] در فرآیندهای التهابی بسیار مهم می باشند. محصولات حاصل از LOX [لوکوترین ها (LTs) و هیدروکسی ایکوزاترآنوئیک (HETES)] اثرات بیولوژیک برجسته ای را روی رشد و نمو سلول های سرطانی انسان ایفا می کنند. بیان ژن LOX-۱۲ در سرطان هایی از قبیل کولون و پروستات افزایش می یابد (۳) همچنین بعضی از سلول های توموری، HETE-۱۲ بیشتری تولید می کنند (۴). پروستاگلاندین ها و سایتوکین های تولید شده در التهاب، تکثیر سلولی را افزایش داده و حمله نوتروفیل ها و ماکروفاژها را نیز تسریع می کنند. در این هنگام، برای افزایش جریان خون و دسترسی به آنتی بادی، آئریوزن تحریک و آپوپتوز مهار می شود (۵).



شکل ۱- سیکل تولید سایتوکینهای پیش التهابی که در اثر در معرض قرار گرفتن مزمن آنتی ژن ایجاد شده و باعث توقف سیستم ایمنی سلولی می شوند (۱).



شکل ۲- مسیر متابولیسم آراشیدونیک اسید (۳).

پروستاگلاندین اندوپراکسید سنتاز نام دارد. دو ایزوآنزیم از COX در بدن پستانداران یافت شده است: COX-1 که در همه بافت‌ها و بطور مداوم بیان شده و در هموستاز عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی مانند پایداری ساختمان موکوس معده و تنظیم جریان خون کلیوی نقش ایفا می‌کنند و COX-2 که در اکثر بافت‌های نرمال بیان نشده، القاء‌پذیر بوده و در فرآیند التهاب نقش ایفا می‌کند. خصوصیات و مشخصات COX-1 و COX-2 در جدول ۱ با یکدیگر مقایسه شده‌اند (۸).

جدول ۱- مقایسه COX-1 و COX-2 (۷).

تنظیم	COX-1	COX-2
میزان بیان	بیان مداوم	القاء شونده
وزن ملکولی	۷۲ کیلو دالتون	۷۲ و ۷۴ کیلو دالتون (دو باند)
اندازه ژن	۲۲ کیلو باز	۸/۳ کیلو باز
کروموزوم در انسان	کروموزوم ۹	کروموزوم ۱
اندازه mRNA	۲/۷ کیلو باز	۴/۵ کیلو باز
جایگاه	شبکه آندوپلاسمی، غشاء هسته	شبکه آندوپلاسمی، غشاء هسته
بیان در بافت	در تمام بافتها	کلیه، کولون، مغز
موتیف TATA (انتهای ۵')	ندارد	دارد
پروموتور	؟	NF-IL6, NF-κB, TCF, CRE

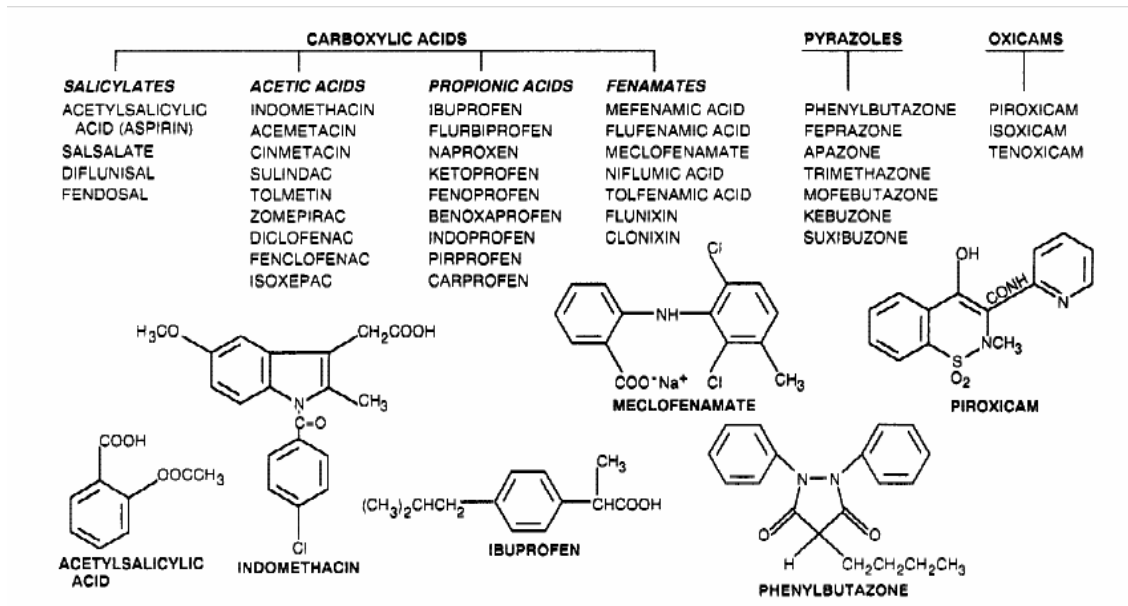
تنظیم مولکولی ژن COX-2

سنتز پروستاگلاندین‌ها توسط COX-2، در بافت‌های بدخیم و متورم با عوامل مختلفی نظیر فاکتورهای رشد، تومور پروموتورها، میتوژن‌ها، سایتوکسین‌ها و انکوژن‌ها تنظیم می‌شود. این اثرات در نتیجه فعال شدن فسفولیپازها می‌باشد که آراشیدونیک اسید بیشتری را برای فعالیت COX فراهم می‌کنند. دو ایزوآنزیم COX (COX-1 و COX-2) مستقل از هم تنظیم می‌شوند. COX-1، همیشه و در همه جا بیان می‌شود، در صورتی که COX-2 فقط در پاسخ به یک تحریک خاص بیان می‌شود (۹).

COX-2 در بافت‌های طبیعی موکوسی کولون در سطح بسیار پایینی بیان می‌شود. ولی در ۵۰٪ آدنوماها و ۸۰٪ کارسینوماهای کولورکتال انسان، بیان بالای COX-2 (در سطح پروتئین و mRNA) دیده می‌شود. در محیط کشت سلول‌های سرطانی کولورکتال نیز سطح COX-2 mRNA و PGG2، در سلول‌های در حال تکثیر و متمایز نشده در مقایسه با سلول‌های متمایز بیشتر است (۱۰).

مکانیسم معمول افزایش بیان COX-2 در سرطان کولورکتال (CRC) هنوز شناخته نشده است. القاء‌کننده‌های شناخته شده بیان COX-2، فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها، هورمون‌ها، انکوژن‌ها یا تومور پروموتورها می‌باشند (۱۱). در مطالعه‌ای ثابت شده که IGF-II (فاکتور رشد شبه انسولین-II) از طریق مسیر PI3 Kinase/AKT/ NF-κB در القاء COX-2 مؤثر است. آسپرین نیز با کاهش IGF-II و در نتیجه NF-κB (فاکتور هسته‌ای κB)، در کاهش فعالیت COX-2 و افزایش آپوپتوز در رده سلولی سرطانی کولورکتال مؤثر می‌باشد (۱۰). هم‌چنین سایتوکین‌های التهابی مثل TNF-α و IL-1 با فعال‌سازی NF-κB و MAPK (پروتئین کیناز فعال‌کننده میتوژن) در افزایش بیان COX-2، در بسیاری از بافت‌ها نقش دارند (۱۲). محرک‌های خارج سلولی، از طریق یک مسیر وابسته به MAPK، بیان COX-2 را تنظیم می‌کنند. به عنوان مثال TNF-α، IFN-γ و PDGF (فاکتور رشد مشتق شده از پلاکت) از طریق فعال ساختن مسیر پیام بیولوژیک ERK (کیناز تنظیم کننده پیام خارج سلولی) باعث افزایش بیان COX-2 در سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۳).

اکثر عوامل مذکور، در سطح بالایی در CRC بیان شده و در نتیجه باعث القاء COX-2 می‌گردند. هم‌چنین ثابت شده است که در طول مراحل سرطان‌زایی CRC، القاء بیان COX-2 هم‌زمان یا بعد از موتاسیون ژن APC روی می‌دهد و این امر دلالت‌کننده نقش مستقیم موتاسیون APC در بیان COX-2 می‌باشد. بیان APC بطور طبیعی باعث کاهش بیان پروتئین COX-2 می‌شود. با جهش APC، این تنظیم منفی از بین رفته و بیان COX-2 افزایش می‌یابد. همانطور که گفته شد، COX-2 در سطح رونویسی تنظیم می‌شود، ولی با توجه به تغییر بیان پروتئین COX-2 و نه mRNA آن، این احتمال می‌رود که شاید تنظیم COX-2 توسط APC، در سطح ترجمه باشد. از طرف دیگر، APC طبیعی به β-کاتنین متصل می‌شود و این پروتئین نیز مسیر LCF/TCF4 را غیرفعال کرده و آن نیز بیان پروتئین COX-2 را کاهش می‌دهد. این نکته قابل ذکر است که موتاسیون APC از یک طرف باعث افزایش بیان COX-2 و از طرف دیگر افزایش آپوپتوز می‌شود. این احتمال می‌رود که کاهش بیان COX-2 در نتیجه موتاسیون APC، مستقل از اثر APC روی آپوپتوز باشد (۱۴). هم‌چنین استفاده از مهارکننده‌های انتخابی و غیر انتخابی COX، باعث کاهش رشد آدنوماها در موش‌های دارای ژن APC موتانت می‌شوند (۱۴). COX-2/PGE2 طی مکانیسم‌هایی باعث افزایش فعالیت انکوژنی مسیر APC/b-catenin/TGF در رده



شکل ۴- انواع داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (۶).

گیرنده خود به نام c-met باعث رشد و نیز متاستاز تومورهای کولونی می‌گردد. پروستاگلاندین‌های ساخته شده در فرآیند التهاب در سلول‌های توموری کولون نیز از طریق گیرنده EP2 و EP4 و سپس cAMP باعث افزایش ساخت HGF از فیبروبلاست‌های کولونی می‌گردند. NSAIDs با مهار COX-2 و سپس PGE2، سنتز و تولید HGF و در نتیجه رشد سلول‌های توموری را کاهش می‌دهند (۱۷).

NSAIDs و مهار COX-2

در اوایل دهه ۹۰، آسپرین به عنوان اولین داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی با اثرات کاهش تب، بی‌حسی، کاهش درد و التهاب شناخته شد. هم‌اکنون بسیاری دیگر از داروها نیز کشف شده‌اند که اثراتی مشابه با آسپرین دارند. این داروها «داروهای شبه - آسپرین» یا داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) نامیده شدند (شکل ۴) (۶). برخلاف ساختمان شیمیایی متفاوت، این داروها خصوصیات درمانی مشابهی دارند. آنها تب، التهاب، قرمزی، سردرد و درد ناشی از تورم را کاهش می‌دهند. با این وجود، مصرف NSAIDs به صورت وابسته به دوز باعث ناراحتی‌های معده، تأخیر در زمان زایمان و حتی تخریب کلیه می‌گردد (۶).

براساس کینتیک اتصال NSAIDs با COX، آن‌ها را به سه دسته تقسیم‌بندی می‌کنند (جدول ۲) (۹). ترکیبات کلاس I از لحاظ ساختمانی ساده بوده و به عنوان مهارکننده‌های

سلولی سرطانی CRC و در نتیجه بروز سرطان کولورکتال می‌شوند (۱۵). انکوژن Ras نیز مانند APC در تنظیم COX-2 نقش دارد. PGG2 با فعال کردن انکوژن Ras، طی یک مکانیسم فیدبک مثبت باعث فعال کردن COX-2 و در نتیجه تداوم التهاب می‌گردد (۱۳). TNF- α نیز با واسطه EGFR (گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال) باعث جابه‌جایی COX-2 به هسته و تولید PGE2 می‌گردد (۱۰).

مطالعات *in vitro* نشان داده‌اند که سدیم بوتیرات نیز باعث القاء بیان COX-2 می‌شود. همچنین ژن COX-2 ممکن است توسط هیپوکسی سلولی تنظیم شود. هیپوکسی از طریق افزایش فاکتور رونویسی NF-kB در اندوتلیال عروق انسان، باعث افزایش بیان COX-2 می‌شود. عنصر پاسخ به NF-kB در پروموتور ژن COX-2 قرار داشته و بدین ترتیب NF-kB با کنترل بیان COX-2 در آنژیوژنز القاء شده توسط هیپوکسی (hypoxia-induced angiogenesis) دخالت می‌کند (۷).

ترکیبات آندوژن نظیر کموداکسی کولات موجود در صفرا نیز در القاء COX-2 نقش دارند (۱). همچنین یکی از ژن‌هایی که با بیان بالای COX-2 افزایش می‌یابد، mRNA ژن MDR1 یا P-gp (گلیکوپروتئین - P، پروتئین دخیل در مقاومت دارویی) می‌باشد (۱۶). فیبروبلاست‌ها یا فاکتورهای پاراکراین ترشح شده توسط آنها نیز نقش خیلی مهمی را در تغییر رفتار سلول‌های سرطانی ایفا می‌کنند. فاکتور رشد هپاتوسیتی (HGF) ترشح شده از فیبروبلاست بافت کولون، از طریق

Flufenamic acid، باعث مهار فعال شدن نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) و اینترلوکین ۱-آلفا القاء شده توسط لیپوپلی ساکاریدها (LPS)، در رده سلولی ماکروفاژها می شود (۱۸). همان طور که ذکر شد با توجه به نقش COX-2 در افزایش ژن مقاومت به دارو (MDR1)، استفاده از NSAIDها می تواند در کاهش مقاومت به دارو نیز تأثیر داشته باشد (۱۶).

مهارکننده های اختصاصی COX-2

انواع گوناگون NSAIDs، فعالیت هر دو ایزوآنزیم سیلکواکسیژناز - COX-1 و COX-2 را مهار می کنند و همین خصوصیت باعث ایجاد اثرات درمانی و جانبی مشترک این داروها می شود (۶). مهار COX-2 توسط NSAIDها باعث ایجاد اثرات درمانی این داروها شده، ولی مهار COX-1 در بروز عوارض جانبی این داروها مثل تخریب دیواره معده و کلیه دخالت دارد. پروستاگلاندین های دستگاه گوارش عمدتاً از COX-1 مشتق شده اند و نقش اصلی آن ها محافظت موکوس معدی با مهار ترشح اسید، افزایش دفع بی کربنات و ترشح موکوس و نیز پایداری جریان خون موکوس می باشد (۱۹). به همین دلیل مهار COX-1 توسط NSAIDs باعث بروز عوارض مختلف معدی و کلیوی می گردد. در مصرف NSAIDها، عوامل مختلفی از جمله شدت تحریک پذیری موضعی، افزایش بازگشت اسید به موکوس معده، جریان آنتروهپاتیک، جدا کردن اکسیداسیون از فسفریلاسیون و مهار سنتز پروستاگلاندین های محافظت کننده سلولی، در عدم تحمل دستگاه گوارش دخالت دارند. به دلیل بروز عوارض جانبی این داروها امروزه، NSAIDهایی که فقط COX-2 را مهار می کنند، بیشتر مورد توجه قرار دارند. از لحاظ کینتیکی نیز، مهارکننده های COX-2 با این ایزوآنزیم کمپلکس های اتصال محکمی را تشکیل می دهند که بسیار آهسته نیز جدا می گردند. در صورتی که مهار COX-1 توسط NSAIDها، به صورت رقابتی و کاملاً برگشت پذیر انجام می شود (۲۰).

براساس مهار نسبی COX-1 در مقابل COX-2، NSAIDها به سه دسته تقسیم می شوند:

(۱) مهارکننده های قوی COX-1 که فقط COX-1 را مهار می کنند مانند آسپرین، ایندومتاسین و ایبوپروفن. (۲) مهارکننده هایی که COX-1 و COX-2 را به یک اندازه مهار می کنند مانند دیکلوفناک و ناپروکسن (۳) مهارکننده های اختصاصی COX-2 که فقط COX-2 را مهار می کنند مانند BF-389 و NS-398 (۴).

رقابتی، با آراشیدونیک اسید برای اتصال به جایگاه فعال COX (سیلکواکسیژناز و نه پراکسیداز) بطور برگشت پذیر رقابت می کنند. ترکیبات کلاس II مهارکننده های رقابتی وابسته به زمان و برگشت پذیر می باشند. مهارکننده های کلاس III مانند آسپرین با پیوند کوالان به COX-1 و COX-2 متصل می شوند.

جدول ۲- تقسیم بندی داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی بر اساس کینتیک مهار کنندگی آنها (۹،۶)

کلاس I NSAIDها (ساده، رقابتی)
ایبوپروفن، مفنامیک اسید، پیروکسیکام، سولینداک سولفید (متابولیت فعال سولینداک)، ناپروکسن،
6-MNA (متابولیت فعال nabumetone)، فنیل بوتازون، فلوپنامیک اسید، BL-2365
کلاس II NSAIDها (رقابتی، وابسته به زمان، برگشت پذیر)
ایندومتاسین، Flurbiprofen، مکلوفنامیک اسید، دیکلوفناک، BL-2338
BF 389 [†]
DuP 697 [†]
NS-398 [†]
کلاس III NSAIDها (رقابتی، وابسته به زمان، برگشت نا پذیر)
آسپرین، والریل سالیسیلات

† مهار کننده های انتخابی COX-2

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، NSAIDها از لحاظ ساختمان بسیار متفاوت هستند. تفاوت بین کلاس I و II، نه در ساختمان اصلی بلکه در زنجیره جانبی آنهاست (۸). استیلایسیون COX-1 توسط آسپرین، فعالیت COX و نه فعالیت پراکسیدازی را مهار می کند (۶). همچنین استیلایسیون COX-2 توسط آسپرین، فعالیت COX آن را تغییر داده و متابولیت ۱۵R-هیدروکسی ایکوزاتترانوئیک اسید (HETE-۱۵R) را تولید می کند (۶).

آقای Paik و همکاران در سال ۲۰۰۰، گزارش کردند که اسید Flufenamic در صورتی باعث مهار COX-2 می شود که COX-2 قبلاً توسط فعال کننده هایی مانند سایتوکین ها، فعال شده باشد. در غیر این صورت، باعث افزایش بیان COX-2 می شوند. مکانیسم مهار مذکور، احتمالاً از طریق مهار فعال سازی NF- κ B و TGF- α توسط NSAID می باشد، ولی مکانیسم فعال شدن COX-2 توسط NSAIDs، مستقل از فعال سازی NF- κ B است. احتمالاً فعال شدن COX-2، توسط NSAIDs، از طریق فعال شدن γ -PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) می باشد. هم چنین

کادهرین در رده سلولی سرطان کولورکتال (HT-29) می‌گردد (۲۳). مطالعات نشان داده‌اند که آسپرین با افزایش کاتابولیسم پلی آمین‌ها نیز از بروز سرطان کولورکتال جلوگیری می‌کند (۲۴).

مکانیسم اثر NSAIDs در جلوگیری از سرطان کولون

نقش COX-2 و PGE2

همانطور که گفته شد، مکانیسم اصلی اثر NSAIDs در جلوگیری از سرطان کولون مهار COX-2 می‌باشد. PGها، در بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیک از جمله انقباض و انبساط عروق، تحریک یا مهار تجمع پلاکت‌ها، مهار سیستم ایمنی، تسریع رشد و نمو تومورهای بدخیم و دخالت در پاسخ بافت‌های طبیعی و توموری به عوامل سایتوتوکسیک نقش مهمی را ایفا می‌کنند.

بیان بالای COX-2، با افزایش سطح پروتئین آنتی آپوپتوتیک BCL-2 باعث مقاومت رده سلول‌های اپتلیال روده به آپوپتوز می‌گردد (۲۲). هم‌چنین افزایش بالای COX-2، منجر به افزایش مهاجرت سلولی و تهاجم سلول‌ها به بافت‌های اطراف می‌شود که این امر با افزایش بیان انواع مختلفی از متالوپروتئینازهای ماتریکس همراه است (۲۲). تشکیل تیوب‌های اندوتلیال که با افزایش سطح فاکتورهای آنژیوژنیک ارتباط دارد نیز توسط بیان بالای COX-2 تسریع می‌شود (۲۲).

مطالعات نشان داده‌اند که با مهار COX-2، رگ‌سازی جدید (neovascularization) در پاسخ به فاکتورهای رشد اگزوزن نیز متوقف می‌شود (۲۲) که در این رابطه احتمالاً COX-2 توانایی فیبروبلاست‌ها برای تحریک neovascularization را تغییر می‌دهد. همچنین ثابت شده که IL-4 و IL-10 نیز با افزایش بیان COX-2 افزایش می‌یابند (۱).

متابولیت PGE2، با اتصال به گیرنده‌های پروتئین G، در سطح سلول (EP1-4) و تغییر سطح سیتوزولی cAMP، اثرات خود را روی سلول اعمال می‌کنند. داده‌های معتبری وجود دارد که نشان می‌دهند، متابولیت‌های PGI2 و PGD2، گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیر پراکسیزومی (PPAR)، را فعال کرده و بدین ترتیب در تنظیم بیان ژن دخالت می‌کنند. سطح PGE2 بافت‌های سرطان CRC، بیشتر از بافت طبیعی است و همین PGE2 باعث ایجاد اثرات پروکاریسینوژنی می‌شود. به عنوان مثال همان‌طور که گفته شد، PGE2 باعث کاهش آپوپتوز در سلول CRC می‌گردد (۲۲).

مطالعات نشان داده‌اند که مهارکننده‌های اختصاصی COX-2، اثرات ضدسرطان‌زایی مختلفی را به شرح زیر اعمال می‌کنند (جدول ۳) (۲۲):

- ۱- کاهش تعداد آدنوماهای کولورکتال در بیماران FAP
- ۲- کاهش عدد نئوپلازی CRC
- ۳- کاهش پارامترهای رشد و مرگ سلولی در بیماران CRC
- ۴- کاهش neovascularization در بیماران CRC
- ۵- کاهش دانسیته microvessel
- ۶- کاهش سنتز PGE2

جدول ۳- اثرات مهارکننده‌های انتخابی COX-2 در مدل‌های حیوانی سرطان کولورکتال (۲۲)

نوع حیوان	تیمار با NSAIDs	نتیجه
موش APC ^{min}	Celecoxib	کاهش گوناگونی پولیپ
موش APC ^{Δ716}	Rofecoxib	کاهش گوناگونی پولیپ
رت تیمار شده با آزوکسی متان	Celecoxib	کاهش شیوع تومور کاهش گوناگونی
	NS- 398	کاهش شیوع تومور کاهش گوناگونی
	Nimesulide	کاهش شیوع تومور کاهش گوناگونی
Nude mouse xenograft		
	SC- 58125	کاهش رشد سلولی کارسینومای کولون
	Celecoxib	کاهش رشد سلولی کارسینومای کولون

NSAIDs در سرطان کولورکتال

بررسی بافت‌های سرطانی کولون نشان می‌دهد که سطح پروستاگلاندین‌ها (PGs) در بافت توموری و حتی پولیپ‌های آدنومایی افزایش می‌یابد. به همین دلیل استفاده از NSAIDs در درمان CRC، مورد توجه قرار گرفت. آزمایشات مختلف نشان دادند که NSAIDs تشکیل تومور را در جوندگان، هم در مرحله آغاز و هم در مرحله پیشرفت، مهار می‌کنند (۲۱). استفاده منظم از آسپرین یا دیگر NSAIDs، باعث کاهش ۴۰-۵۰ درصدی خطر ابتلا به CRC می‌شود. در تحقیقی نشان داده شد که استفاده از NSAIDs، مانند Sulindac و آسپرین، تعداد و اندازه پولیپ‌های کولونی را در بیماران FAP کاهش داده و موجب کاهش درد در بیماران می‌شود (۲۲). هم‌چنین استفاده از ایندومتاسین (نوعی NSAID)، باعث افزایش بیان APC، کاهش بیان β -کاتنین و القاء بیان E -

می‌تواند سیکل سلولی را در مرحله G1/Go متوقف کرده و از ورود سلول به مرحله S جلوگیری کند (۲۸). سولینداک و سولینداک سولفید نیز با کاهش میزان cdk_8 ($P34^{cdc1}$, $P33^{cdc2}$, $P34^{cdc2}$) و همچنین کاهش فعالیت کینازی $P33^{cdc2}$ و $P34^{cdc2}$ ، باعث متوقف کردن سیکل سلولی در فاز Go/G1 می‌گردند (۲۹).

EGFR/COX-2/PGE2 با فعال کردن مسیر پیام بیولوژیک (گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی) و نیز آنژیوژنز در رشد سلول‌های توموری کولون دخالت می‌کنند (۱۵). همچنین COX-2/PGE2، با فعال‌سازی فعالیت انکوژنی مسیر APC/b-RAS catenin/TCF و نیز مسیر EP_4 -PI₃K-AKT و انکوژن باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی کولون می‌گردند (۱۳).

سیتوکروم C نیز نقش مهمی را در فرآیند آپوپتوز توسط NS-398 در رده سلولی سرطان کولون بازی می‌کند. بدین صورت که NS-398 با رها سازی سیتوکروم C از میتوکندری و فعال سازی Caspase-9 و Caspase-3 و نیز شکستن ADP- (Polymerase (ribose)، باعث آپوپتوز سلول‌های سرطانی کولون می‌گردد. همچنین NS-398 با مهار کاتابولیسیم پروتئین مهارکننده چرخه سلولی به نام P27Kip1، از تکثیر سلول‌های سرطانی ریه نیز جلوگیری می‌کند (۳۰).

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مهار آپوپتوز توسط NSAIDها افزایش پیش‌ساز پروستاگلاندین (آرآشیدونیک اسید (AA) در نتیجه مهار COX-2 می‌باشد. با افزایش AA، مسیر تبدیل اسفنگومیلین به سرامید تحریک شده و سرامید بیشتری تولید می‌شود. سرامید یکی از واسطه‌های مهم در مسیر آپوپتوز می‌باشد (شکل ۵) (۳۱). کاهش جابه‌جایی فاکتور هسته‌ای NF-kB و نیز فعال کردن گیرنده فعال‌کننده تکثیر پراکسیز می (PPAR) نیز از دیگر اعمال NSAIDها در جلوگیری از رشد سلولی می‌باشد (۷).

ب - آنژیوژنز

رشد تومورهای جامد و متاستاز آن‌ها، به ایجاد رگ خونی جدید بستگی دارد. مطالعات ثابت کرده‌اند که سلول‌های توموری با ترشح فاکتورهای رشد عروقی مثل فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (bFGF)، فاکتور رشد مشتق شده از پلاکت (PDGF)، رشد خود را تضمین می‌کنند. در بین فاکتورهای ذکر شده VEGF، مهم‌ترین فاکتور برای آنژیوژنز تومورها و در نتیجه متاستاز آنها می‌باشد. به نظر می‌رسد که COX-2 در کنترل فاکتورهای

سلول‌های سرطانی ترانسفورم شده در مواجهه با PGE2، تکثیر بیشتری پیدا کرده و سریع‌تر مهاجرت می‌کنند که این عمل، احتمالاً توسط اتصال به گیرنده PGE2 (SubtypeEp4) انجام می‌شود. PGE2 همچنین باعث القاء B1 - hereregulin می‌شود که در مهاجرت سلولی و متاستاز دخالت دارد (۲۲). افزایش بیان COX-2 در سرطان، با کاهش آرآشیدونیک اسید همراه است. آرآشیدونیک اسید (AA) یک پیامبر ثانویه بوده و باعث تحریک آپوپتوز می‌شود. بنابراین کاهش AA در سرطان، منجر به مهار آپوپتوز می‌شود (۲۵).

نقش دیگر عوامل مستقل از PGE2

بعضی از NSAIDها، می‌توانند رشد و مرگ سلولی را مستقل از توانایی آن‌ها در مهار COX-2 - البته در دوزهای بالا - به صورت‌های تغییر دهند (۷):

الف - آپوپتوز و رشد سلولی

بطور کلی تنظیم آپوپتوز در سلول‌ها به نوع سلول و تعادل بین فاکتورهای تحریک‌کننده و مهارکننده آپوپتوز بستگی دارد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که بیان بالای COX-2 باعث مهار آپوپتوز و افزایش رشد سلولی می‌شود. هنوز مکانیسم دقیق مولکولی رابطه بین بیان COX-2 و مهار آپوپتوز مشخص نشده است. افزایش بیان COX-2 ابعاد سلول‌های سرطانی را افزایش داده و باعث تجمع تغییرات ژنتیکی متوالی که در ایجاد سرطان دخالت دارند، می‌گردد. در ذیل، به اختصار چند مکانیسم عمل COX-2 در آپوپتوز بیان شده است:

بیان بالای ژن Bcl-2 و نه Bax یا Bcl-x

افزایش در پروتئین کیناز فعال‌کننده میتوزن (MAPK)

افزایش فعالیت توموروزنیستی پروتئین H-ras

کاهش فعالیت پروتئاز فعال‌کننده آپوپتوز (caspase-3)

افزایش فاکتورهای رشد سلولی مثل HGF

تولید Ros و فعال کردن c-fos، c-myc و c-jun

غلظتی از NSAIDها که برای مهار رشد سلولی مورد نیاز است، در حدود ۱۰۰-۱۰ برابر غلظتی است که برای مهار COX-2 نیاز می‌باشد (۲۶). در مطالعه‌ای ثابت شده است که تیمار رده سلول‌های سرطانی کولورکتال با ایندومتاسین و NS-398، باعث افزایش بیان تومور ساپرسورژن MAP، PTEN، کیناز فسفاتاز ۳ - (MKP-3) و پروتئین تیروزین فسفاتاز (SHP2) می‌گردد. به علاوه تیمار این سلول‌ها با NS-398، افزایش بیان ژن‌های آپوپتوتیک مثل STAT1، CASP3 را نشان داده است (۲۷). celecoxib که نوعی NSAID است

القاء سنتز PG مؤثر است. رشد تومور نیز غالباً با توقف سیستم ایمنی در ارتباط است. فاکتورهای تحریک کننده کولونی (CSF) که از سلولهای توموری رها می شوند، منوسیت ها و ماکروفاژها را تحریک کرده تا PGE2 را بسازند و در نتیجه از تولید لمفوکین های تنظیم کننده ایمنی، تکثیر سلول های B و T و فعالیت سایتوتوکسیسیته سلول های NK (کشنده طبیعی) جلوگیری کنند. همچنین PGE2، باعث مهار تولید فاکتور نکروز توموری و افزایش تولید IL-10 گشته که این دو با هم باعث مهار سیستم ایمنی می گردند. NSAID ها با مهار COX-2 و PGG2 از بروز حالات فوق جلوگیری می کنند (۷). استفاده از عصاره های گیاهی می تواند در جلوگیری از رشد تومور مؤثر باشد. آقای دکتر هدایتی و همکاران در سال ۲۰۰۵ طی مطالعه ای نشان دادند که عصاره گیاه دافنه ماکروناتا باعث افزایش رهایی TNF- α از مونوسیت های انسانی و در نتیجه کاهش حجم و حذف تومورهای پستانی در رت های ماده می گردد (۳۳،۳۲). در طی مطالعه ای دیگر، محققین مذکور نشان دادند که عصاره آب الکلی (۵۰:۵۰) برگ گیاه *Dendrostellera lessertii* (سیاه گینه) نیز با تأثیر بر رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا و تعداد گیرنده های این فاکتور بروی مونوسیت های انسانی در محیط کشت، در کاهش اندازه و تعداد تومورهای آدنوکارسینوم روده بزرگ و پستان در رت مؤثر می باشد (۳۴). هم چنین روشی سریع و مؤثر برای اندازه گیری TNF- α و نیز نیتریک اکسید توسط محققین مذکور با روش ایمونواسی ارائه گردیده است (۳۵،۳۶).

ه - متابولیسم گزنوبیوتیک ها

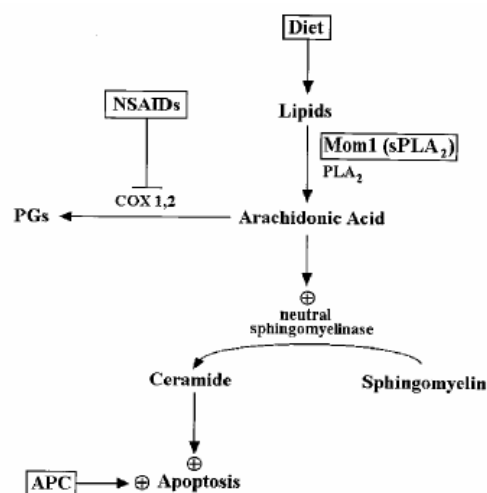
همانطور که گفته شد آنزیم COX-2، دارای دو عملکرد مجزا از هم است. فعالیت اکسیژناز COX-2 که آراشیدونیک اسید را به PGG2 اکسید کرده و فعالیت پراکسیدزای COX-2 که PGG2 را به PGH2 تبدیل می کند. هم چنین فعالیت پراکسیدزای COX-2، باعث تغییر پروکارسینون ها به کارسینون ها و گزنوبیوتیک ها به موتاژن ها می شود. فعالیت پراکسیدزای COX-2 به خصوص در سرطان کولون بسیار اهمیت دارد، زیرا کولون همیشه در معرض انواع مختلفی از گزنوبیوتیک ها می باشد. بعلاوه متابولیسم AA، در اثر فعالیت پراکسیدزای COX-2 در تولید موتاژن ها دخیل است. محصولات فرعی اکسیداسیون AA، مثل MDA (مالون دی آلدید)، از نظر شیمیایی بسیار فعال بوده و با DNA اتصال برقرار می کنند. به دلیل اینکه نقش NSAID ها در جلوگیری از CRC، به صورت مستقل از PGE2، در صورت مصرف دوزهای بالا امکان پذیر است، بنابراین اثرات دوزهای

رشد و ماشین تنظیمی آنژیوژنز دخالت می کند. محصول TXA2-COX-2 نیز ممکن است به عنوان یک فعال کننده قوی آنژیوژنز عمل کند (۷). محصولات متابولیکی COX-2، باعث neovascularization و متاستاز می شوند. همچنین مهار کننده های انتخابی COX-2 با مهار بیان bFGF و VEGF، آنژیوژنز را مهار می کنند.

ج - تهاجم به بافت های اطراف و متاستاز

یک اتفاق کلیدی در پیشرفت تومورهای جامد، توانایی سلول های ترانسفورم شده به بافت های دور و نزدیک می باشد. امروزه مطالعات کمی ثابت کرده اند که COX-2 ممکن است در خصوصیات تهاجمی سلول های سرطان انسانی دخیل باشد. تهاجم به بافت ها با فعال شدن ماتریکس متالوپروتئیناز ۲- (MMP-2) و ماتریکس متالوپروتئیناز ۷- (MMP-7) در ارتباط است. COX-2 در تولید و ترشح MMP ها نقش مهمی را ایفا می کند. استفاده از مهار کننده های COX-2، باعث مهار فعال شدن MMP ها و در نتیجه مهار متاستاز می شود (۹). در مطالعه ای نشان داده شده است که NS-398، با کاهش آزادسازی MMP-2 و MMP-9، باعث مهار متاستاز سلول های سرطانی پروستات می گردد. همچنین NS-398، ساخت MMP-2 و نیز فعالیت پروموتور آن را مهار کرده و باعث افزایش کاتابولیسم آن می شود (۳۰).

د - التهاب و مهار سیستم ایمنی



شکل ۵- ارتباط بین مسیر متابولیسم آراشیدونیک اسید و سرامید و پیشگیری از سرطان کولورکتال (۳۱).

التهاب مزمن یک عامل خطر شناخته شده در سرطان سلول های اپیتلیال می باشد. التهاب هم به عنوان علت و هم به عنوان معلول سرطان است. التهاب با افزایش سایتوکین ها در

درمانی NSAIDها بیشتر از طریق تاثیر بر COX-2 اعمال می‌شود. (۲۲).

نتیجه‌گیری

التهاب در نتیجه تأثیر انواع گسترده‌ای از عوامل خارجی روی بافت‌های مختلف به وجود آمده و پیشرفت می‌کند. ارتباط نزدیکی بین بیماری‌های التهابی و بروز سرطان در بافت‌های مربوطه وجود دارد. سایتوکین‌های التهابی مثل پروستاگلاندین‌ها و لوکوترین‌ها در فرآیند التهاب بسیار دخیل هستند بطوری‌که مهار سنتز این سایتوکین‌ها در جلوگیری از

بروز سرطان یا تأخیر آن مؤثر می‌باشد. داروهای خاصی که آنزیم‌های کلیدی مسیر متابولیسمی تشکیل سایتوکین‌های التهابی را هدف قرار می‌دهند، در درمان سرطان بسیار مؤثر هستند. امروزه استفاده از NSAIDها و مهارکننده‌های اختصاصی COX-2 در درمان التهاب بسیار رایج است و تحقیقات گسترده‌ای نیز در این زمینه صورت می‌گیرد. امید است با کشف و شناخت انواع جدیدتری از داروها بتوان راهی مفید و مؤثر در درمان التهاب و جلوگیری از سرطان پیشنهاد کرد.

REFERENCES

- Sharma RA, Dalglish AG, Steward WP, O'byrne KJ. Angiogenesis and the immune response as targets for the prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2003;10:1625-31.
- Lupulescu A. Enhancement of carcinogenesis by prostaglandins in male albino Swiss mice. *J Natl Cancer Inst* 1987;61:97-106.
- Steele VE, Hawk ET, Viner JL, Lubet RA. Mechanisms and applications of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of cancer. *Mut Res* 2003;523:137-44.
- Gao X, Gringnon D.J, Chbihi T, Zacharek A, Chen YQ, Sakr W, et al. Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology* 1995;46:223-27.
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, Dubois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1995;93:705-16.
- Taketo MM. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Tumorigenesis (Part I). *J Nat Cancer Inst* 1998;90:1529-36.
- Dempke W, Rie C, Grothey a, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:411-17.
- Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:3-21.
- Smith WL, DeWitt DL. Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Nephrol* 1995;15:179-94.
- Di Popolo A, Annamaria Memoli, Apicella A, Tuccillo C, Palma AD, Ricchi P, Acquaviva AM, Zarrilli R. IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2000; 19: 5517 – 5524.
- Grau R, Iniguez MA, Fresno M. Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor, and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in colon carcinoma cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor-g independent mechanism. *Cancer Research* 2004;64:5162-71.
- Paik JH, Ju JH, Lee JY, Boudreau MD, Hwang DH. Two opposing effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem* 2000;275:28173-79.
- Wang D, Buchanan FG, Wang H, K. Dey S, DuBois RN. Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res* 2005;65:1822-22.
- Sunayama K, Konno H, Nakamura T, Kashiwabara H, Shoji T, Tsuneyoshi T, et al. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in two different morphological stages of intestinal polyps in APC (^{Min/+}474) knockout mice. *Carcinogenesis* (Lond.) 2002;23:1351-59.
- Shao J, Jung S, Liu C, Sheng H. Prostaglandin E2 Stimulates the b-Catenin/T Cell Factor-dependent Transcription in Colon Cancer. *J Biol Chem* 2005;280:26565-72.
- Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2002;277:38915-20.
- Ota S, Tanaka Y, Bamba H, Kato A, Matsuzaki F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may prevent colon cancer through suppression of hepatocyte growth factor expression. *Euro J Pharmacol* 1999;367:131-38.

18. Paik JH, Ju JH, Lee JY, Boudreau MD, Hwang DH. Two opposing effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem* 2000;275:28173-79.
19. Riendeau D, Charleson S, Cromlish W, Mancini JA, Wong E, Guay J. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:1088-95.
20. Dewitt DL. Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* 1999;55:625-31.
21. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Nat Cancer Inst* 1998;90:1609-20.
22. Peek Jr RM. Prevention of colorectal cancer through the use of COX-2 selective inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:S50-S56.
23. Kapitanovic S, Čačev T, Anticaa M, Kralja M, Cavric'G, Pavelic' k, et al. Effect of indomethacin on E-cadherin and b-catenin expression in HT-29 colon cancer cells. *Exp Mol Pathol* 2006;80:91-96.
24. Turchanowa L, Dauletbaev N, Milovic V, Stein J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs stimulate spermidine/spermine acetyltransferase and deplete polyamine content in colon cancer cells. *Eur J Clin Invest* 2001;31:887-93.
25. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *PNAS* 2000;97:11280-85.
26. Dihlmann S, Siemann A, Magnus von Knebel Doeberitz M. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate b-catenin/TCF-4 signaling. *Oncogene* 2001;20:645-53.
27. Chu EC, Chai J, Tarnawski AS. NSAIDs activate PTEN and other phosphatases in human colon cancer cells: novel mechanism for chemopreventive action of NSAIDs. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:875-79.
28. Gro'sch S, Tegeder I, Niederberger E, Bra'utigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB* 2001;15:2742-44.
29. Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96: 491-503.
30. Gao XQ, Han JX, Huang HY, Song B, Zhu B, Song CZ. Effect of NS-398 on metastasis-associated gene expression in a human colon cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2005;11:4337-43.
31. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;95:681-86.
۳۲. هدایتی م، یزدان پرست ر، عزیزی ف. تاثیر عصاره Daphne mucronata بر down regulation گیرنده های $TNF-\alpha$ منوسیت های کشت شده انسانی. یاخته، ۱۳۸۴؛ دوره ۷، صفحات ۱۵۲ تا ۱۵۷.
33. Hedayati M, Yazdanparast R, Fasihi.H, Azizi.F. Anti-tumor Activity of Daphane mucronata Extract and its Effect on $TNF-\alpha$ Receptors and $TFN-\alpha$ Release in Cultured Human Monocytes. *Pharmaceut Biol* 2003;41:194-98.
۳۴. هدایتی م، یزدان پرست ر، جعفری ب، عزیزی ف. تاثیر عصاره Dendrostellera lessertii بر آزادسازی و down regulation گیرنده های $TNF-\alpha$ منوسیت های کشت شده انسانی. پژوهش در پزشکی، ۱۳۸۵؛ دوره ۲۹، صفحات ۳۳۷ تا ۳۴۲.
35. Hedayati M, Yazdanparast R, Azizi, F. Determination of human tumor necrosis factor alpha ($TNF-\alpha$) by a highly sensitive enzyme immunoassay. *Biochem Biophys Res Comm* 2001;289:295-98.
36. Ghasemi A, Hedayati M, and Khoshbaten A. Evaluation of a simple and rapid method for serum nitric oxide determination in microplate. *Inter J Endocrinol Metab* 2006;7:433-439.