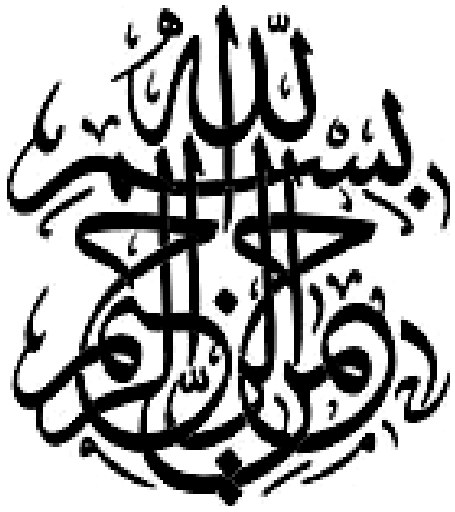


دانشگاه الزهرا(س)

دانشکده ی علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه ی کارشناسی ارشد

رشته ی بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان

خالص سازی نسبی پیگمان های کاروتنوئیدی ازجدایه ی ASB107 *Kocuria*و ارزیابی اثر سیتوتوکسیک آن بر روی دودمان سلولی ملانومای SK-MEL-3

استادان راهنما

دکتر عزت عسگرانی

دکتر طوبی غضنفری

دانشجو

سمیه چراغی هفشجانی

بهمن ۱۳۹۱

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق به

دانشگاه الزهرا(س)است.

چکیده ی فارسی

در این مطالعه، استخراج پیگمان های کاروتنوئیدی از باکتری*kocuria* ASB 107 برای اولین بار، با استفاده از روش های مختلف فیزیکی و شیمیایی انجام شد. نتایج نشان می دهد در بین تمام روش های به کار رفته، انجماد و ذوب توده سلولی و سپس به هم زدن آن با استفاده از هم زن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه در حلال متانول، با داشتن بیشترین جذب در ۴۷۰ نانومتر و بی رنگ شدن کامل توده سلولی، مناسب ترین روش استخراج عصاره ی کاروتنوئیدی از باکتری *kocuria* ASB107 است. سه لکه در کروماتوگرافی لایه نازک عصاره ی پیگمان های استخراج شده، جدا شد. پیگمان شماره یک دارای R_f مساوی با کانتاگزانتین استاندارد بود و طیف جذبی تک قله ای متقارنی را ارائه داد. تست اسیدسولفوریک و کاروتنوئید برای همه ی لکه ها مثبت بود بنابراین ثابت شد که پیگمان ها،کاروتنوئیدی هستند. با توجه به عوارض جانبی روش های شیمی درمانی موجود در درمان سرطان و خواص ضد سرطانی کانتاگزانتین، در ادامه تحقیق اثر سیتوتوکسیک کانتاگزانتین بر روی رده ی سلولی ملانوما SK-MEL3 بررسی شد. قابلیت زنده ماندن سلول ها با روش MTT assay تعیین شد که فعالیت میتوکندری ها فعال و بنابراین سلول های زنده را به نمایش می گذارد. نتایج نشان می دهد که کانتاگزانتین در یک روش وابسته به دوز و زمان دارای اثر سیتوتوکسیک بر روی رده ی سلولی ملانوما SK-MEL3 است و کاهش در قابلیت زنده ماندن سلول ها، در غلظت ۲۰، ۴۰ و۶۰ میکرومولار کانتاگزانتین معنی دار است .

فهرست

عنوان	صفحه
فصل اول	
مقدمه	
۱-۱- مشخصات باکتری *Kocuria* ASB107	۱
۱-۲- کاروتنوئیدها	۲
۱-۲-۱- خواص فیزیکی وشیمیایی کانتاگزانتین	۲
۱-۲-۲- سنتز شیمیایی کانتاگزانتین	۴
۱-۲-۳- بیوسنتز کانتاگزانتین	۵
۱-۲-۴- کانتاگزانتین وکاربردهای آن	۷
۱-۲-۵- اثر کانتاگزانتین بر روی پیگمانتاسیون انسان	۸
۱-۲-۶- نقش آنتی اکسیدانی کانتاگزانتین	۹
۱-۲-۷- کانتاگزانتین و سیستم ایمنی	۱۰
۱-۲-۸- اثر کانتاگزانتین بر آنزیم های متابولیزه کننده ی ترکیبات غیر زیستی	۱۰
۱-۲-۹- اثرضدسرطانی کانتاگزانتین و مکانیسم اثر آن	۱۱
۱-۲-۱۰- کانتاگزانتین و مهار متاستاز	۱۲
۱-۲-۱۱- اثرکانتاگزانتین برسرطان پوست در مدل های حیوانی	۱۳
۱-۲-۱۲- کانتاگزانتین و القای آپوپتوز در رده سلولی ملانوما SK-MEL-2	۱۴
۱-۳- سرطان پوست ملانوما (Melanoma)	۱۶
۱-۳-۱- انواع سرطان های ملانوم	۱۸
۱-۳-۲- مرحله بندی ملانوما	۱۹
۱-۳-۳- اپیدمیولوژی	۲۰
۱-۳-۴- روش های درمان	۲۲

فصل دوم

مواد و روش ها ۲۳

۲-۱- مواد و وسایل ۲۴

۲-۱-۱- موادو وسایل موردنیاز برای کشت باکتری وجمع آوری آن ۲۴

۲-۱-۲- مواد و وسایل موردنیاز برای استخراج وآنالیز پیگمان ۲۵

۲-۱-۳- مواد و وسایل مورد نیاز برای کشت سلول ۲۷

۲-۲- روش ها ۲۹

۲-۲-۱- شرایط کشت باکتری ۲۹

۲-۲-۲- تعیین وزن خشک ۲۹

۲-۲-۳- انتخاب روش وحلال مناسب برای استخراج پیگمان ۳۰

۲-۲-۴- خالص سازی نمونه ۳۲

۲-۲-۴-۱- جزء بندی کردن (partitioning) ۳۲

۲-۲-۴-۲- صابونی کردن ۳۳

۲-۲-۴-۳- کروماتوگرافی لایه نازک ۳۴

۲-۲-۵- آنالیز وشناسایی پیگمان ها ۳۴

۲-۲-۵-۱- تست کاروتنوئید (Carr-Price test) ۳۴

۲-۲-۵-۲- تست اسید سولفوریک ۳۴

۲-۲-۵-۳- تست flexirubin ۳۵

۲-۲-۵-۴- طیف جذبی پیگمان ۳۵

۲-۲-۵-۵- تعیین ضریب پخش ۳۶

۲-۲-۵-۶- محاسبه مقدار کل کاروتنوئیدها و کانتاگزانتین ۳۷

۲-۲-۶- روش کشت سلول ۳۸

۲-۲-۷- تهیه محلول استوک کانتاگزانتین ۴۳

۲-۲-۸- تیمار سلول ها با کانتاگزانتین ۴۴

۲-۲-۹- بررسی سیتوتوکسیسیته به روشMTT assay ۴۴

۲-۲-۱۰- آنالیز آماری نتایج ۴۵

فصل سوم

نتایج ۴۶

۳-۱- کشت باکتری *Kocuria* ASB107 ۴۷

۳-۲- استخراج پیگمان با استفاده از روش ها وحلال های مختلف ۴۸

۳-۳- جزء بندی کردن(partitioning) وخالص سازی نمونه ۵۰

۳-۴- کروماتوگرافی و طیف جذبی ۵۱

۳-۵- تست flexirubin ۵۵

۳-۶- تست تشخیص کاروتنوئید ۵۶

۳-۷- تعیین ضریب پخش ۵۷

۳-۸- محاسبه ی مقدار کل کاروتنوئیدها و کانتاگزانتین ۵۸

۳-۹- کشت رده سلولی ملانوما SK-MEL3 در محیط کشت RPMI ۵۹
٪۱۰FBS+٪۹۰

۳-۱۰- نتایج اثر کانتاگزانتین بر بر رده ی سلولی ملانوما (SK-MEL3) ۶۰

۳-۱۰-۱- اثر کانتاگزانتین بر رده ی سلولی ملانوما (SK-MEL3) در۲۴ساعت ۶۰

۳-۱۰-۲- اثر کانتاگزانتین بر رده ی سلولی ملانوما (SK-MEL3) در ۴۸ ساعت ۶۱

۳-۱۰-۳- اثر کانتاگزانتین بر رده ی سلولی ملانوما (SK-MEL3) در ۷۲ساعت ۶۲

فصل چهارم

بحث ۶۴

پیشنهادات ۶۹

فصل پنجم منابع ۷۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مشخصات باکتری *Kocuria* ASB107

جنس کوکوریا بر اساس تفاوت های فیلوژنتیک و شموتاکسونومیک درسال ۱۹۹۵ از جنس میکروکوکوس جدا شد (Stackebrand, 1995) و به نام میراوسلاوکوکور نامگذاری شد. اعضای این جنس طبق رده بندی زیر در کلاس Actinobacteria قرار می گیرند.

bacteria ⟶ Actinobacteria ⟶ Actinomycetales⟶ Micrococcineae ⟶ Micrococcaceae ⟶ *Kocuria* ⟶ *Kocuria* ASB107

تا سال (۲۰۱۰) ۱۷گونه ی کوکوریا شناسایی شده است که همگی کوکسی گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی، کاتالاز مثبت، کواگولاز منفی هستند و بر روی سطح آگار کلونی آن ها به رنگ قرمز، صورتی، نارنجی، زرد و کرم دیده می شود. اعضای این جنس بر اساس نوع پپتیدوگلیکان (L-Lys-Ala3/4)، حضورگلوکزآمین و گلیکوزآمین به عنوان قندهای آمینه ی دیواره ی سلولی، حضور MK-7(H2) و MK-8(H2) به عنوان مناکوئینون های اصلی، لیپیدهای قطبی دی فسفاتیدیل گلیسرول و فسفاتیدیل گلیسرول و مقدار DNA G+C که بین mol% ۷۵-۶۰ متغیر است از دیگر جنس های راسته ی Actinomycetales قابل تشخیص هستند (Savini, 2010).

باکتری*kocuria* ASB107 در سال۱۳۸۷ از چشمه ی رادیواکتیو آب سیاه رامسر جداسازی و شناسایی شده است. این جدایه ۹۹/۷٪ به سویه ی*K. rosea* DSM 20447 و ۹۹/۵٪ به سویه ی *K. Polaris* DSM 14382 شباهت دارد (برزویی،۱۳۸۷).

در بررسی های قبلی مشخص شده است این باکتری قادر به مقاومت در برابر پرتوهای یونیزه کننده (D_{10} = ۲KGy) و پرتوی فرابنفش(D_{10} =۴۰۰ J/m^2) می باشد (برزویی،۱۳۸۷). -=- داشتن پیگمان های کاروتنوئیدی به عنوان ترکیبات خاموش کننده ی گونه های فعال اکسیژن یکی از برتری های اکولوژیک باکتری هایی است که تحت شرایط اکسیداتیو زیست

می کنند (Tian, 2007). این باکتری نیز دارای پیگمان های نارنجی است که در این تحقیق کاروتنوئیدی بودن آن ها بررسی و اثبات شد .

۱-۲- کاروتنوئیدها

کاروتنوئیدها پیگمان های محلول در چربی و متعلق به خانواده ی بزرگ ترپنوئیدها هستند . این ترکیبات به فراوانی در طبیعت یافت می شوند و تا کنون ساختار شیمیایی بیش از ۷۰۰ کاروتنوئید مختلف شناسایی شده است . هیدروکربن کاروتنوئیدها با نام کاروتن شناخته شده و مشتقات اکسیژن دار آن زانتوفیل ها نامیده می شوند .

با توجه به این که پیگمان کاروتنوئیدی اصلی که از این باکتری استخراج و شناسایی شده است یک کاروتنوئید به نام کانتاگزانتین (canthaxanthin) است در ادامه مطلب به طور اختصاصی در مورد کانتاگزانتین و مطالعات انجام شده بر روی این کاروتنوئید پرداخته می شود.

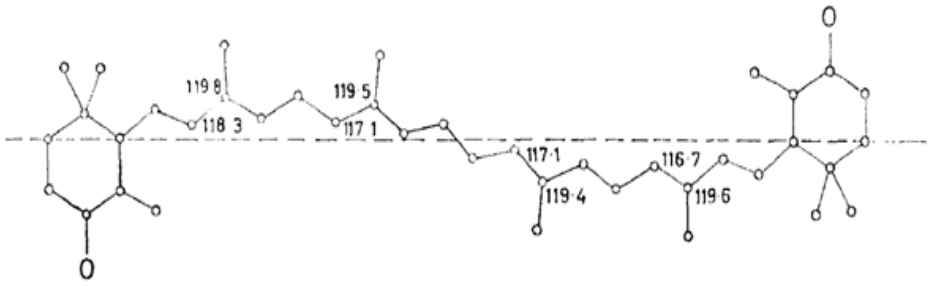
۱-۲-۱- خواص فیزیکی و شیمیایی کانتاگزانتین

کانتاگزانتین یک کتو کاروتنوئید با فرمول شیمیایی $C_{40}H_{52}O_2$ است . این پیگمان نارنجی دارای جرم مولی $g\ mol^{-1}$ ۵۶۴ /۸۲ و دمای ذوب ۲۱۲°C است. کانتاگزانتین غیر قابل حل در آب بوده و به میزان اندکی در استون حل می شود (EFSA, 2010).

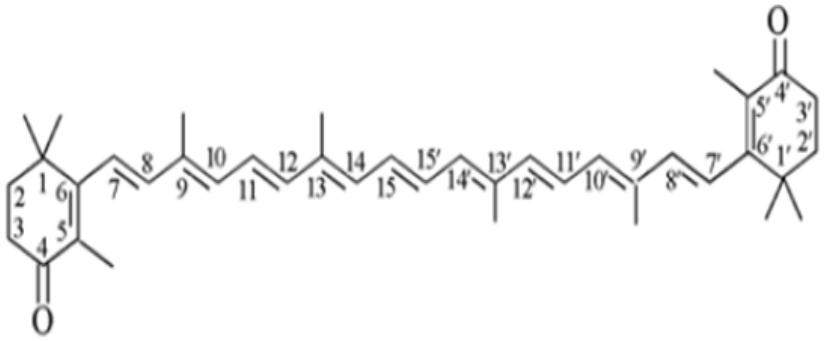
نام ایوپاک کانتاگزانتین β,β-Carotene-4,4'-dione است اما به اسامی مختلف دیگری نیز شناخته می شود که در زیر آورده شده است (ChemIDplus advanced, 2008).

"Food Additive 161g", "C.I. Food Orange 8", "CI 40850", "Carophyll red", "Orobronze", "Roxanthin red 10SD", "Roxanthin red 10, "L-orange 7", "4, 4' -diketo-beta-carotene", "4, 4' -dioxo-beta-carotene", "xanthin colour".

برخلاف سایر کاروتنوئیدها که دارای طیف جذبی سه قله ای هستند کانتاگزانتین طیف جذبی تک قله ای پهن و متقارن دارد و به ترتیب در پترولیوم اتر،کلروفرم و اتانول دارای بیشترین جذب در طول موج ۴۸۲،۴۶۶ و۴۷۴ نانومتر است (Davies, 1976 and Britton, 1995) . در مطالعات کریستالوگرافی کانتاگزانتین آشکار شده است که زنجیره ی پلی ان (polyene) در کانتاگزانتین تقریباً مسطح با یک خمیدگی S شکل است. خمیدگی (شکل۱-۱) به خاطر ممانعت فضایی گروه های متیل در اتم های کربن ۹ و ۱۳ نسبت به اتم های هیدروژن است. ساختار مولکولی کانتاگزانتین در شکل ۲-۱ نشان داده شده است که دارای یک زنجیره ی پلی ان با نه پیوند دوگانه ی کربن -کربن مزدوج است (MacGillavry, 1968).



شکل ۱-۱: خمیدگی S شکل زنجیره ی پلی ان در کانتاگزانتین

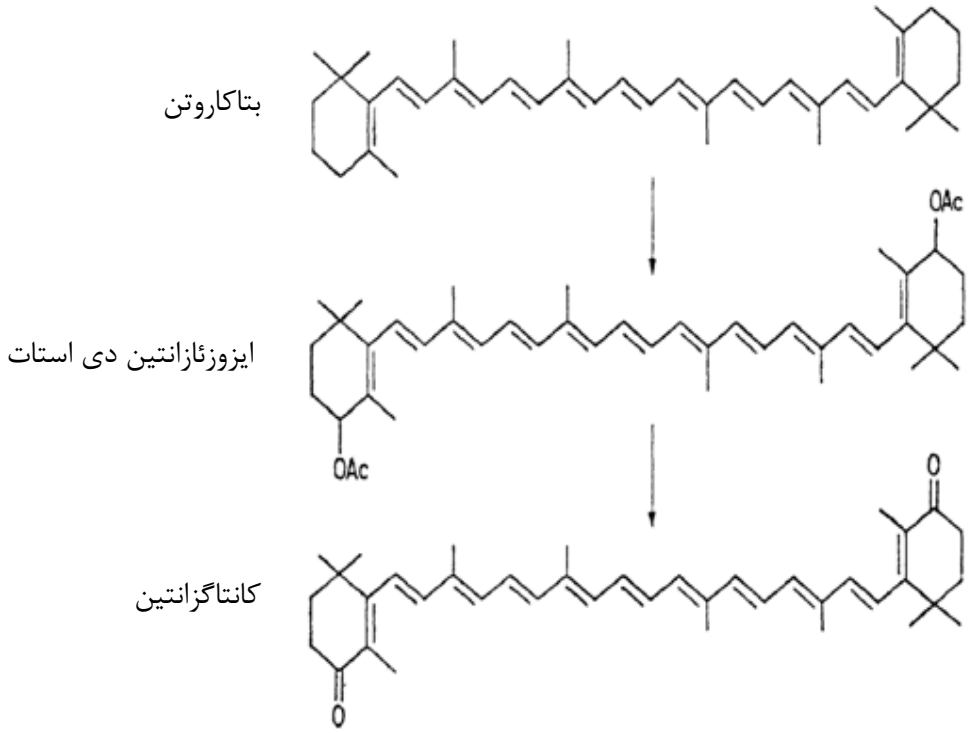


شکل ۲-۱: ساختار مولکولی کانتاگزانتین

۱-۲-۲- سنتز شیمیایی کانتاگزانتین

سنتز کانتاگزانتین برای اولین بار ، بر اساس روش زیر انجام شده است (شکل ۳-۱) .

در این روش سنتز کانتاگزانتین از بتاکاروتن شروع می شود. بتاکاروتن در تیمار با N-bromosuccinimid در استیک اسید و کلروفرم به ایزوزئازانتین دی استات (isozeaxanthin diacetate) تبدیل می شود که پس از صابونی شدن به منظور ساخت کانتاگزانتین تحت اکسیداسیون قرار می گیرد(Karre, 1950). سنتز کانتاگزانتین به صورت کاملاً شیمیایی درسال ۱۹۵۶ انجام شد (Isleer, 1956) و به دنبال آن ،کانتاگزانتین در سال ۱۹۶۴ به بازار معرفی شد .

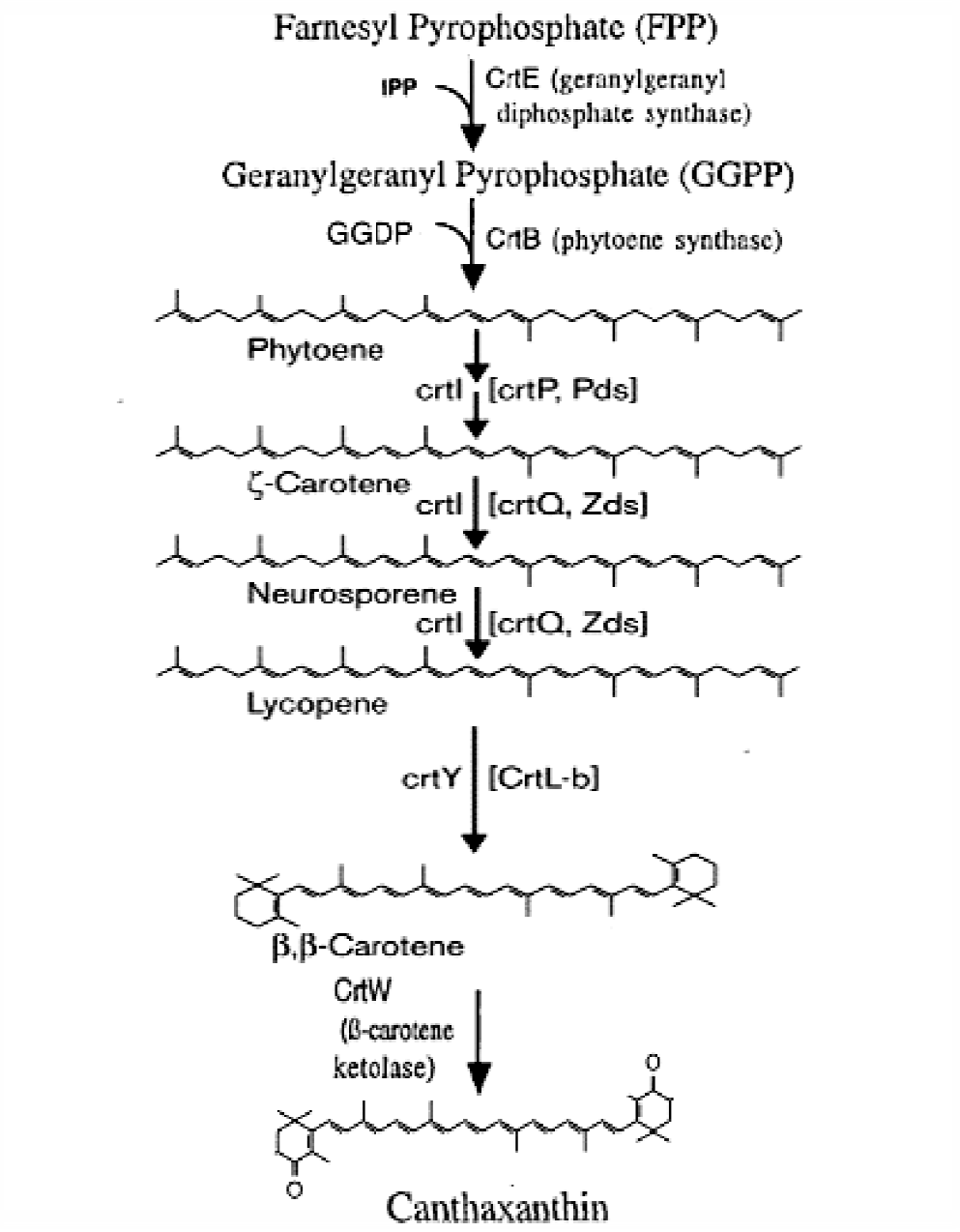


شکل ۳-۱: سنتز شیمیایی کانتاگزانتین از بتاکاروتن

۱-۲-۳- بیوسنتز کانتاگزانتین

سنتز کاروتنوئیدها از استیل کوآنزیم A آغاز می شود. این ماده طی چند مرحله به ترکیبی شش کربنه به نام موالونیک اسید که پیش ساز ترپن ها است تبدیل می شود و این سنتز به علت نام این ماده به مسیر موالونات معروف شده است. با اضافه شدن فسفر به ساختمان موالونات مولکولی پنج کربنه به نام ایزوپنتنیل پیروفسفات(IPP) تولید می شودکه با اتصال چهار مولکول آن، گرانیل گرانیل دی فسفات (GGDP) بیست کربنه به وجود می آید (شکل ۴-۱). از اتصال دو مولکولGGPP از قسمت انتهایی به یکدیگر مولکول چهل کربنه و بی رنگ فیتوئن حاصل می شود که حاوی سه پیوند دوگانه ی مزدوج و شش پیوند دوگانه ی غیر مزدوج می باشد. این واکنش توسط فیتوئن سنتاز کاتالیز می شود. فیتوئن با دهیدروژنه شدن و افزایش پیوندهای دوگانه طی چند مرحله به لیکوپن تبدیل می شود. فیتوئن ابتدا از طریق تشکیل مولکول حد واسط فیتوفلوئن به زتاکاروتن که حاوی ۷ پیوند دوگانه ی مزدوج است و رنگ نارنجی کمرنگی دارد تبدیل می شود و سپس زتاکاروتن از طریق مولکول حد واسط نئوروسپورن به لیکوپن قرمز رنگ تبدیل می شود.

سایر کاروتنوئیدها از لیکوپن سنتز می شوند و با اضافه شدن حلقه بتا و یا مولکول های اکسیژن به ساختمان آن، کاروتنوئیدهای دیگر شکل می گیرند (Mantzouridou, 2008). تفاوت سنتز کاروتنوئیدها در گیاهان و میکروارگانیسم ها در این است که میکروارگانیسم ها قادرند به یک باره فیتوئن را به لیکوپن تبدیل نمایند و به همین دلیل سرعت سنتز لیکوپن در آن ها بسیار بالاتر از گیاهان است (Paredes-Lopez, 2007). بتاکاروتن با واکنش آنزیمی بتاکاروتن سنتاز از لیکوپن که یک کاروتنوئید بدون حلقه است ساخته می شود و با افزوده شدن دو گروه کتو در محل کربن شماره ۴ حلقه، به کانتاگزانتین تبدیل می شود.این واکنش توسط آنزیم بتاکاروتن کتولاز کاتالیز می شود(Hannibal, 2000).



شکل ۴-۱: مسیر بیوسنتز کانتاگزانتین

۱-۲-۴- کانتاگزانتین و کاربرد های آن

کانتاگزانتین به طور گسترده در طبیعت یافت می شود. این کتو کاروتنوید برای اولین بار از قارچ خوراکی *Cantharellus cinnabarinus* جدا شد (Haxo, 1950).کانتاگزانتین در ریز جلبکها (Czygan, 1968 and Hertzberg, 1966)، ماهی هایی مثل ماهی کپور، شاه ماهی طلایی (Czeczuga, 1973)، خانواده خرچنگ های دریایی مانند میگو (Thommen, 1964) و در منابع زیستی دیگر مانند باکتری ها (Saperstein, 1954) و قارچ ها (Krupa, 2009) یافت می شود. با این وجود در حال حاضر تنها از طریق سنتز شیمیایی در مقیاس صنعتی تولید می شود و هیچ منبع زیستی که استخراج کانتاگزانتین از آن از لحاظ اقتصادی ارزان باشد وجود ندارد(Bhosale, 2005). استفاده از کانتاگزانتین تحت E number ، E161g در ایالات متحده آمریکا و اروپا مورد تأیید قرار گرفته است (U.S.FDA, 2011). امروزه از کانتاگزانتین به عنوان یک افزودنی مجاز در پرورش ماهی قزل آلا و سالمون به منظور خوش رنگ شدن گوشت و پوست آن ها(Zhu, 2009) و همچنین در صنایع طیور برای پر رنگ تر کردن زرده تخم مرغ استفاده می شود (Esfahani-Mashhour, 2008). در تخم مرغ کانتاگزانتین از زرده به جنین انتقال می یابد و با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانتی آن می تواند در حفاظت جنین در برابر آسیب های اکسیداتیو در مرحله نمو و به طور خاص در مرحله حساس خروج از تخم و مراحل اولیه ی زندگی مؤثر باشد. کانتاگزانتین در خوراک دهی مرغ های تخم گذار می تواند تا mg/kg ۸ وزن مرغ به خوراک آن اضافه شود. برای سایر ماکیان، سالمون و قزل آلای پرورشی حداکثر سطح مجاز mg/kg ۲۵ است (SCAN, 2002). طبق تأیید کمیته EFSA [1] کانتاگزانتین به عنوان یک افزودنی مجاز غذایی تنها به سوسیس استراسبرگ که عمدتاً به فرانسه صادر می شود اضافه می شود (EFSA, 2010). کانتاگزانتین در بیماران مبتلا

1- European Food Safety Authority

به ناهنجاری ارثی به نام پروتوپورفیرا اریتروپویتیک (erythropoietic protoporphyria) که به نور حساسیت شدید دارند به منظور کاهش و درمان راش ، خشکی و اگزما به کار گرفته شده است (Norris, 1990).

۱-۲-۵- اثر کانتاگزانتین بر روی پیگمانتاسیون انسان

یک رسوب برگشت پذیر کریستال های کانتاگزانتین در شبکیه ی تعداد محدودی از افرادی که مقادیر بسیار بالایی از کانتاگزانتین را از طریق قرص های برنزه کننده دریافت کرده بودند مشاهده شدکه پس از متوقف کردن مصرف قرص ها رسوب به طور کامل ناپدید شد. توجه به این نکته ضروری است که برای رسیدن به مقدار جذب یکسان، یک فرد باید روزانه بیش از ۵۰ عدد از تخم مرغ هایی استفاده کند که توسط مرغ هایی تولید می شود که در غذایشان مقادیر کاربردی کانتاگزانتین وجود دارد. با این وجود استفاده از کانتاگزانتین به عنوان یک چاشنی غذای انسان و خوراک دام، چندین بار در سطح بین المللی و اتحادیه ی اروپا با جزئیات بیشتری مورد بازنگری قرار گرفت. اولین بازبینی در سال ۱۹۹۵تکمیل شد و توسط کمیته ی JECFA[2] منتشر شد و برداشت قابل قبول روزانه (ADI[3]) برای کانتاگزانتین ۰/۰۳ mg/kg وزن بدن تعیین شد.کار JECFA در سال ۱۹۹۷توسط SCF[4] مورد بازنگری و تأیید قرار گرفت.[5] EFSA در سال ۲۰۱۰ نسخه جدیدی از ارزیابی ایمنی کانتاگزانتین را منتشر کرد که در آن همان ADI قبلی مجدداً مورد تأیید قرار گرفت (EFSA, 2010) .

2- Joint Experts Committee on Food Additives – a joint WHO/FAO committee

3-Acceptable Daily Intake

4- EU Scientific Committee for Food

5- European Food Safety Authority

۱-۲-۶- نقش آنتی اکسیدانی کانتاگزانتین

گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) مثل رادیکال های سوپراکساید ($O_2^{\bullet -}$) و رادیکال های هیدروکسیل ($OH^{\bullet -}$) درطول بسیاری از فرایندها و واکنش های متابولیکی طبیعی بدن مانند سیستم انتقال الکترون میتوکندری(Shigenaga, 1994) و انفجار تنفسی فاگوسیت ها (Meydani, 1995) آزاد می شوند. همچنین آلودگی هوا ، دود سیگار، قرارگرفتن در معرض مواد شیمیایی و اشعه ی فرابنفش نیز می توانند باعث افزایش این رادیکال ها شود. ROS ها بسیار فعال هستند و قادرند به غشای سلولی، پروتئین ها و DNA آسیب برسانند. آسیب های اکسیداتیو رابطه ی مستقیمی با بیماری های مختلف مانند تخریب ماکولای وابسته به سن، سرطان، دیابت ، بیماری های قلبی، کاتاراکت، پارکینسون و آترواسکلروزیس، آلزایمر و پیری دارد. بدن به عنوان یک مکانیسم دفاعی تعدادی از آنتی اکسیدانت های آندوژن را برای حفظ بهینه ی تعادل آنتی اکسیدانت : اکسیدانت بدن تولید می کند، اما با این وجود در زمان افزایش استرس های اکسیداتیو مصرف آنتی اکسیدانت ها ضروری است. کاروتنوئیدها آنتی اکسیدانت های بیولوژیکی قوی هستند که از طریق خاموش کردن اکسیژن منفرد و غیر فعال کردن رادیکال های آزاد عمل می کنند (Palozza, 1992 and Burton, 1989). توانایی کاروتنوئیدها در خاموش کردن اکسیژن منفرد به تعداد پیوندهای دوگانه ی مزدوج موجود در مولکول بستگی دارد (Foote, 1970). کانتاگزانتین به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی عمل می کند (Palozza, 1992). سیستم پیوندهای دوگانه ی مزدوج در کانتاگزانتین با گروه های کربونیل گسترش یافته است. این ویژگی باعث شده است که خواص آنتی اکسیدانتی کانتاگزانتین بیشتر از بتاکاروتن و زئازانتین باشد (Terao, 1989). برخلاف برخی از کاروتنوئیدها مانند بتاکاروتن که می توانند در سیستم های بیولوژیکی هم به عنوان آنتی اکسیدانت و هم به عنوان پرواکسیدانت بسته به غلظتشان و فشار اکسیژن عمل کنند

(Burton, 1984) ، زانتوفیل هایی مانند آستاگزانتین و کانتاگزانتین حتی در غلظت بالای کاروتنوئید و فشار بالای اکسیژن، رفتار پراکسیدانت از خود نشان نمی دهند و به عنوان آنتی اکسیدانت های خالص مطرح می شوند (Beutner, 2001 and Martin, 1999).

۱-۲-۷-کانتاگزانتین و سیستم ایمنی

برای اولین بار نقش ویژه کاروتنوئیدها بر روی سیستم ایمنی توسط بندیچ و ساپیروگزارش شد. آن ها نشان دادند که تکثیر میتوژنیک قابل القای لنفوسیت ها در موش هایی که با کانتاگزانتین تغذیه شده بودند، افزایش می یابد (Bendich and Shapiro, 1986) . شوارتز در مطالعات خود نشان داد فعالیت پراکسیداز و سیتوکروم اکسیداز در ماکروفاژهای تیمار شده با کانتاگزانتین، بتاکاروتن و آلفاکاروتن در مقایسه با رتینوئیک اسید افزایش می یابد و فعالیت تحریک کنندگی کانتاگزانتین بسیار بیشتر از بتاکاروتن و آلفاکاروتن است . فاگوسیت ها نیز با درجه کمتر توسط این کاروتنوئیدها تحریک می شوند (Schwartz, 1990) .

۱-۲-۸- اثر کانتاگزانتین بر آنزیم های متابولیزه کننده ی ترکیبات غیر زیستی

یکی از عملکردهای تنظیمی کاروتنوئیدها، القای آنزیم های متابولیزه کننده ی ترکیبات غیر زیستی است. کاروتنوئیدها ممکن است با تحریک سم زدایی ترکیبات سرطان زا به پیشگیری از سرطان کمک کنند . تعدادی از مطالعات این اثر تنظیمی کاروتنوئیدها را در کبد موش نشان می دهند. آنزیم های ویژه ای که توسط کانتاگزانتین القا می شوند شامل P4501A1 ،P4501A2 ، CYP1A1 وCYP1A2 می باشند که در متابولیسم سرطان زا های بالقوه مانند هیدروکربن های چندحلقه ای آروماتیک، آمین های آروماتیک و آفلاتوکسین درگیر هستند (Gradelet 1996, 1997, 1998). همچنین مشخص شده است که کانتاگزانتین منجر به القای آنزیم های P450 در بافت ریه وکلیه ی موش نیز می شود (Jewell, 1999).

۱-۲-۹-اثرضدسرطانی کانتاگزانتین و مکانیسم اثر آن

کانتاگزانتین به عنوان آنتی اکسیدانت (Palozza, 1992)، تقویت کننده ی سیستم ایمنی (Schwartz, 1990) و بهبود دهنده ی اتصالات gap junction از طریق القای ژن connexin43 (Zhang, 1992) عمل می کند. همچنین گزارش شده است که کانتاگزانتین رشد سلول های تومور را از طریق القای آپوپتوز، توقف در پیشرفت چرخه ی سلولی و کاهش همزمان در بیان انکوژنیک سیکلین D1 مهار می کند (Palozza, 1998). همه این عملکردها به عنوان مکانیسم های ممکن در اثر ضد سرطانی کانتاگزانتین مطرح است. مطالعات بسیار زیادی برای بررسی اثر ضدسرطانی کانتاگزانتین در مدل های حیوانی و کشت سلول انجام شده است. مطالعات بر روی مدل های حیوانی نشان می دهد که کانتاگزانتین منجر به کاهش معنی دار در اندازه و تعداد تومورهای فلسی حفره دهانی در هامسترها (Schwartz, l988)، پیشگیری از نئوپلازمی های دهانی در رت های تیمار شده با ۴- نیتروکوئینولین۱- اکسید(Takuji, 1995)، تاخیر در پیشرفت تومور تیموس در موش (Palozza, 1997) می شود.

از جمله رده های سلولی که به اثر ضد سرطانی کانتاگزانتین پاسخ می دهند می توان به ملانومای موشی ، فیبروسارکوما و کارسینومای فلسی انسانی (Huang, 1992) اشاره کرد .

برتمن و همکارانش در مطالعات خود نشان دادند وسعت ترانسفورماسیون بدخیمی القا شده با اشعه X وmethylcholanthrene در سلول های فیبروبلاست جنینی موش (C3H l0TI/2) در تیمار با بتاکاروتن وکانتاگزانتین کاهش می یابد. در هر دو مورد ،کاروتنوئیدها در فاز آغازین پیشرفت ترانسفورماسیون بدخیمی عمل می کنند و زمانی سودمند خواهند بود که یک هفته بعد از تیمار با اشعه ی X مورد استفاده قرار گیرند و هنگامی که قبل و یا همزمان با تابش اشعه به محیط کشت سلول ها افزوده شوند بی اثر هستند (Bertram, l988).

انوجی وهمکارانش اثر ضد سرطانی کاروتنوئیدهایی مانند آلفاکاروتن ، بتاکاروتن وکانتاگزانتین را بر روی رده های سلول سرطانی کلون انسان (Colo320DM وDLD-1) بررسی کردند و نشان دادند این کاروتنوئیدها به طور معنی داری منجر به کاهش قابلیت زنده ماندن سلول های Colo320DM و DLD-1 می شوند درحالی که رتینوئیک اسید اثر مهاری کمی بر روی رشد این رده های سلولی داشت. باتوجه به این که کانتاگزانتین قادر به تبدیل به ویتامین A نیست، آن ها پیشنهاد کردند که کاروتنوئیدها به طور مستقیم و نه از طریق تبدیل به ویتامین A رشد سلول های سرطانی را مهار می کنند(Onogi, 1998).

۱-۲-۱۰- کانتاگزانتین و مهار متاستاز

تهاجم سلول های سرطانی یک مرحله مشخص و مهم متاستاز سلول های سرطانی است که متوقف کردن آن می تواند منجر به افزایش طول عمر مبتلایان به سرطان شود. کوزوکی و همکارانش در سال ۲۰۰۰ اثر کانتاگزانتین و هفت کاروتنوئید دیگر(آلفاکاروتن، بتاکاروتن، بتاکریپتوزانتین، لیکوپن، لوتئین، زئازانتین و آستاگزانتین) در مهار تهاجم سلول های سرطانی هپاتومای AH109A سفاق رت را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق بعد از کشت تک لایه ی سلول های مزوتلیال مشتق از روده بند(M –cells) ، سلول های هپاتوما به همراه غلظت مشخصی از کاروتنوئیدها بر روی M –cells کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت تعداد سلول ها و کلونی های مهاجم که به زیر M –cells مهاجرت کردند با میکروسکوپ فاز کنتراست شمارش شدند و مشاهده شد که این کاروتنوئیدها در غلظت μM ۲۰-۰/۲۵ اثر مهاری بر روی تهاجم سلول های هپاتومای AH109A دارند. تفاوت های ساختاری موجود در بین ۸ کاروتنوئید تأثیر اندکی بر روی اثر سرکوب کنندگی آن ها بر تهاجم سلول های AH109A داشت. در این مطالعه برای بررسی ارتباط بین خاصیت آنتی اکسیدانتی کاروتنوئیدها و مهار تهاجم سلول های سرطانی، سلول های هپاتوما با سیستم HX-XO