مقاله پژوهشی

بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی آویشن باغی بر رده‌ی سلولی سرطان پستان

دکتراحمد همتا[1]، صفیه قزاقی[2]

[1] استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی وسیتوژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه علوم اراک، اراک، ایران

[2] دانشجوی کارشناسی ارشدژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه علوم اراک، اراک، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: اراک، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست شناسی، صفیه قزاقی
E-mail: ghazaghisafieh@yahoo.com

وصول:۹۲/۱۰/۱۳، اصلاح:۹۲/۱۱/۳۰، پذیرش:۹۲/۱۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان دربین زنان ایرانی می‌باشد. خوشبختانه این سرطان از زمره‌ی سرطان‌های قابل پیشگیری وقابل تشخیص زودرس است. عصاره‌ی هیدروالکلی برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار گیاه آویشن باغی، دارای ترکیبات گوناگونی است که مهم-ترین آنها تیمول و کارواکرول می‌باشند. اثرات ضد سرطانی عصاره‌ی مذکور را به‌طور عمده به این ترکیبات نسبت می‌دهند. هدف ازاین تحقیق، مقایسه‌ی اثر بخشی عصاره‌ی هیدروالکلی و تاکسول برروی سلولهای رده4t1 ومیزان تأثیرآن‌ها برالقاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، سلول های سرطانی رده4T1 از انسیتیو پاستور تهران خریداری و عصاره‌ی هیدروالکلی به‌روش سوکسله تهیه‌شده‌است. میزان سایتوتوکسیسیتی پنج دوز مختلف از عصاره و پنج دوز مختلف از تاکسول در زمان های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت به‌دست آورده‌شده وبدین منظور، توانایی زیستی سلول‌ها با روش MTT و تریپان بلو بررسی‌گردیده‌است. هم‌چنین بررسی تغییرات مورفولوژیک با روش‌های رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید انجام‌شده‌است.

یافته‌ها: سلول‌های تحت تیمار با عصاره‌ی هیدروالکلی و تاکسول در زمان‌های مختلف تفاوت بارز و وابسته به دوزی را نشان داده‌اند به-طوری که تیمار همزمان عصاره‌ی هیدروالکلی با تاکسول نسبت به تیمار تاکسول و تیمار عصاره‌ی هیدروالکلی می‌تواند تعداد بیشتری سلول را از بین ببرد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی هیدروالکلی می‌تواند سایتوتوکسیسیتی تاکسول را افزایش‌دهد بنابراین هم می‌تواند در درمان سرطان سینه مؤثر باشد و احتمالاً با القا آپوپتوزیس باعث مرگ سلول‌ها گردد.

واژه‌های کلیدی: *سرطان پستان، تاکسول، گیاه آویشن باغی، سایتوتوکسیسیتی*

مقدمه

در کشورهای توسعه یافته بیش از ۱۰٪ کل هزینه-ی مراقبت‌های پزشکی برای سرطان صرف می‌شود. سرطان در صورت عدم درمان، به‌طور حتم به مرگ منجرخواهد شد(۱). بدن انسان، مجموعه‌ای از سلول-هایی‌است که هرکدام وظیفه‌ی خاصی به‌عهده دارند. اگر

سلولی به‌صورت غیرقابل کنترل رشد وتکثیر یابد، مشکلات بسیاری برای خود ودیگر سلول‌ها ایجاد خواهد کرد (۲). سرطان در واقع رشد غیر قابل کنترل سلول است. تکثیر سلولی، منجر به تشکیل توده‌ای موسوم به «نئوپلاسم» یا «تومور» می‌شود. ممکن است با انتشار به محل‌های دورتر به متاستاز بینجامد(۱). به‌عبارت ساده‌تر، سرطان نوعی بیماری است که درآن، سلول‌های غیرطبیعی به شکل مهار ناپذیری تقسیم می شوند و قادرند به سایر بافت‌ها حمله‌کنند(۳).

کارشناسان می‌گویند از هر هشت زن، یک نفر شانس ابتلاء به سرطان پستان را داراست(٤). ترس ابتلاء به سرطان پستان، منجرشده که زنان با بروز علائم درپستان مراجعه‌ی خود را به پزشک تعویق بیندازند ومانع تشخیص ودرمان به موقع بیماری توسط پزشک شوند(٤). هرچند امروزه از روش‌های درمانی متفاوتی از قبیل جراحی، پرتودرمانی و درمان کمکی یا مکمل(هورمون درمانی- شیمی درمانی)برای درمان سرطان پستان استفاده می‌شود(۵)، اما باتوجه به پیچیدگی مکانیسم و وجود عوامل متعدد در ایجاد سرطان، تاکنون درمان قطعی برای این بیماری یافته‌نشده‌است.

هم اکنون با وجود پیشرفت کاربرد داروهای سنتزی، هنوز گیاهان دارویی واشکال دارویی حاصل از آنها در مقیاس وسیعی مورد استفاده قرارمی‌گیرند. به‌طوری‌که در برخی کشورها، از اجزای لاینفک سیستم دارودرمانی محسوب می‌شوند و بازار تجارت آنها نیز در مقایسه با سایر داروهای شیمیایی رونق افزونتری دارد(٦). اخیراً تلاش‌های فراوانی برای شناخت همه جانبه‌ی گیاهان دارویی از نظر نوع گیاهان و پراکنش آنها در ایران، شرایط اکولوژیک استفاده‌های دارویی، استخراج، تجزیه، شناسایی مواد مؤثر، کشت واهلی کردن، اصلاح گونه‌های مهم، بررسی روش‌های نوین در افزایش مواد مؤثر ومطالعه اثرات دارویی آنها صورت‌گرفته‌است.

آویشن، نیز یکی از گیاهانی است که دارای خاصیّت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد. چیزی که به‌تازگی و در یکی دودهه‌ی اخیر موردتوجه محققان قرارگرفته، خواص ضدسرطانی وآنتی کارسینوژنیک آن می‌باشد (۷).

آویشن باغی، از جمله‌ی گیاهان دارویی است که بر مبنای اطلاعات حاصل از طب سنتی، اثرات درمانی گوناگونی را به آن نسبت می‌دهند. اثرات مذکور شامل ضدالتهابی، ضدعفونی‌کننده، ضدسرفه، ضداسپاسم و خلط‌آور هستند(۷ و۸). عصاره‌ی هیدروالکلی برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار گیاه آویشن باغی، دارای ترکیبات گوناگونی است که مهم‌ترین آنها تیمول و کارواکرول می‌باشند. اثرات بیولوژیکی و درمانی عصاره‌ی مذکور را به‌طور عمده به این ترکیبات نسبت می‌دهند که درصد زیاد و قابل توجهی از عصاره‌ی هیدروالکلی را شامل می‌شوند (۹). لذا در این پژوهش، تأثیر پنج دوز از عصاره‌ی هیدوالکلی گیاه آویشن باغی و گروه شاهد آنها بر سلول‌های سرطان پستان رده4T1 انجام گرفته و باداروی ضدسرطانی تاکسول مقایسه‌شده‌است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ابتداء رده‌ی سلولی 4T1 از بانک سلولی انسیتوپاستور تهران خریداری و سلول‌ها براساس پروتکل دفریز گردیده‌اند. سپس در محیط کشت RPMI (تهیه شده از شرکت بازرگانی صدف نیلگون پارس) دارای ۱۰ درصدFBS (تهیه شده از شرکت نوآوری زیستی گویا) کشت‌داده‌شده و پس از ٢٤ ساعت، پاساژ سلولی انجام‌گرفته و سلول‌ها به دو فلاسک حاوی ۱۵ ml محیط کشت RPMI سرم دار توزیع‌شده‌است.

برای تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن باغی از روش سوکسله استفاده‌شده‌است. این شیوه، توسط دانشمند معروف «سوکسله» ابداع‌گردیده‌است. دراین روش، ماده‌ی گیاهی را در محفظه‌ای که اکثراً از جنس کاغذ صافی تهیه می‌شود، قرارداده و داخل دستگاه سوکسله وارد می‌گردد. دراین‌حال، با تبخیر مرتب حلال

از بالن تحتانی، به‌طورمداوم، حلال خالص بر روی ماده‌ی گیاهی قرارگرفته و موجب خروج کامل مواد مؤثر از درون سلول‌های گیاهی می‌گردد.

در این تحقیق، از دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیترعصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن باغی و ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تاکسول و یک گروه شاهد فاقد تاکسول و عصاره‌ی استفاده‌شده‌است. درساخت غلظت‌های موردنیاز، دوز اصلی غلیظ‌ترین دوز است که غلظت‌های بعدی ازآن تهیه گردیده‌است. پس از ساخته شدن دوز اصلی، با فیلتر سرسورنگی استریل وسپس مقدار مورد نیاز از آن برداشته‌شده تا با به‌حجم‌رساندن توسط محیط کشت غلظت‌های موردنظر تهیه‌گردند. برای تهیه‌ی دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی استوک mgr/ml ۱۰است که برای ساخت دوز ۱۰۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر، ۱۰۰میکرولیترازاستوک با ۹۰۰ میکرولیترمحیط سرم‌دار مخلوط شده تا، دوز مورد نظر ساخته‌شود. دوز ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شامل ۸۰ میکرولیتر استوکو ۹۲۰ میکرو لیتر محیط سرم‌دار، دوز ٤۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر شامل ٤۰ میکرولیتر استوکو ۹٦۰ میکرولیترمحیط سرم‌دار، دوز ۲۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر شامل ۲۰ میکرولیتر استوکو ۹۸۰ میکرولیترمحیط سرم‌دارو دوز ۱۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیترشامل ۱۰ میکرولیتر استوکو ۹۹۰ میکرو لیتر محیط سرم‌دار است.

به‌منظور بررسی اثرکاهنده و یا افزاینده‌ی عصاره‌ها بر سایتوتوکسیسیتی القاء شده توسط تاکسول، تاکسول به‌همراه هریک از عصاره‌ها به‌صورت همزمان و با دوزهای متناظر (برای ترکیب عصاره‌ی هیدروالکلی ۱۰۰+۰/۰۰۱، ۲۰۰+۰/۰۱، ٤۰۰+۰/۱، ۸۰۰+۱، ۱۰۰۰+۱۰) و تاکسول و عصاره‌ی هیدروالکلی هرکدام به تنهایی در زمان های ۲٤، ٤۸ و۷۲ساعته روی سلول ها اثردادەشده و میانگین توانایی زیستی سلول‌ها به‌روش های جذب - تریپان بلو و رنگ سنجیMTT محاسبه و برای بررسی تغییرات مورفولوژیکی، از روش‌های رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید استفاده‌شده‌است. برای محاسبه‌ی میانگین سنجش زیستی عصاره‌ها و داروی تاکسول از نرم‌افزار SPSS16 و از آنالیز یک‌طرفه (ANOVA one way) و تست Tukey استفاده شده و p-value کمتر از ۰.۰۵ معنادار تلقی گردیده است.

روش MTT

پس از پاساژ دادن سلول‌ها و شمارش آنها با هموسیتومتر، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹٦ خانه ریخته‌شده و به‌مدت ۲٤ ساعت با محیط کشت سرم‌دار در انکوباتور قرارگرفته تا سلول‌ها به کف چاهک-ها بچسبند. سپس ویال‌ها را با بافر شست و شوداده و با ۱۰۰میکرولیتر محیط تازه و ۲۰میکرولیتر از دوز مورد نظر تیمارکرده‌شده و هر تیمار، سه بار تکرارگردیده‌است. سپس پلیت‌ها به‌مدت‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ساعت در انکوباتور CO2 دار و دمای ۳۷ درجه قرارگرفته‌شده‌است. پس ازطی زمان مورد نظر، محیط قبلی برداشته و با بافر شست‌وشو داده‌شده و ۱۰۰میکرولیتر محیط تازه‌ی بدون سرم و ۱۰ میکرولیتر محلول MTT به هر ویال اضافه-گردیده و به‌مدت ٤ ساعت در انکوباتور قرارگرفته‌شده-است. پس ازگذشت ٤ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج و محیط حاوی MTT برداشته‌شده و به هر ویال ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول ریخته و سپس به‌مدت ۲ ساعت در تاریکی قراردادەشده‌است. بعد ازگذشتن این مدت، محتوای هر چاهک به یک چاهک خالی در مجاورت آن منتقل شده‌است. جذب نوری (دانسیته نوری OD) متعلق به هر چاهک در طول موج بین ۵۷۰ تا ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA-reader مدل DLAGNOSTIC خوانده و از فرمول ذیل، برای محاسبه‌ی میزان زنده بودن سلول‌ها استفاده‌گردیده‌است (۱۰).

100×(OD کنترل/ نمونه OD) =توانایی زیستی سلولها

روش تریپان بلو

تعداد ۱۰۰۰۰۰۰سلول در پلیت ٦ خانه ریخته وسپس

شماره گذاری‌شده وبه هر پلیت ۲-۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه و به‌مدت ۲٤ ساعت و به‌منظور اتصال سلول‌ها به بستر خود در انکوباتور قرارگرفته‌شده‌است. پس از ۲٤ ساعت، محیط رویی سلول‌ها خارج ومحیط فاقد سرم حاوی عصاره با دوزهای مختلف ۵ خانه پلیت اضافه وخانه‌ی ششم کنترل در نظرگرفته‌شده، به‌مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور CO2 قرارگرفته‌شده‌است. بعد از این مدت تمام، خانه‌های پلیت تریپسین زنی شده‌است. سپس با اضافه‌کردن محیط کشت کامل، تریپسین غیر فعال و به نسبت ۱:۱ تریپان بلو ٤/. درصد به هر خانه اضافه‌شده-است. پلیت به‌مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه، نکوبه‌گردیده‌است. شمارش سلولها با استفاده از لام نئوبار(در خانه‌های متعلق به شمارش گلبول‌های سفید) انجام گرفته‌است. سلول‌های آبی رنگ به‌عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های بی‌رنگ به‌عنوان سلول‌های زنده درنظرگرفته شده‌است. سپس با استفاده از فرمول ذیل، درصد حیات سلول‌ها در هر غلظت محاسبه‌گردیده‌است (۱۱).

viability = (تعداد سلول های زنده/تعداد کل سلولها)×۱۰۰

تست‌های رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید

در رنگ‌آمیزی هوخست برای بررسی مورفولوژی هسته‌ی سلول‌ها، از میکروسکوپ فلورسانس استفاده شده است. برای انجام این تست، پس از ریختن سلول‌ها در پلیت ٦ خانه، پلیت به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور قرارگرفته و پس از سپری‌شدن زمان لازم، محیط رویی برداشته و ویال‌ها با دوز موردنظر در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت تیمارشده و پس از گذشت زمان موردنظر، محیط رویی کشیده و ویال‌ها با بافر شست‌وشوداده‌شده و به هر ویال ۱۰۰میکرولیتر بافر فسفات به‌همراه ۱۰۰میکرولیتر محلول هوخست اضافه‌گردیده و به‌مدت ٦ تا ۸ دقیقه، انکوبه‌شده‌است. سپس سلول‌ها، با بافر شست-وشو داده‌شده و هسته‌ی سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس مطالعه‌گردیده‌است. در رنگ‌آمیزی هوخست، سلول‌ها به‌صورت آبی‌رنگ می‌شوند. در مرحله‌ی بعد، هرچاهک با بافرشست‌وشو داده‌شده ورنگ پروپیدیوم آیوداید اضافه‌گردیده‌است. دراین حالت، رنگ پروپیدیوم آیوداید با اتصال به شیارهای DNA هسته‌ی سلول‌های مرده را به رنگ قرمز درمی‌آورد(۱۲).

یافته‌ها

نتایج سنجش توان زیستی سلول‌ها براساس روش MTT در جدول ۱ و ۲ و ۳ و روش تریپان بلو در

جدول ۱:میانگین توان زیستی سلول‌های رده 4T1 ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس ازتیمار بادوزهای مختلف تاکسول باروش MTT.

زمان	شاهد	غلظت				
		۰/۰۰۱ µgr/ml	۰/۰۱ µgr/ml	۰/۱ µgr/ml	۱ µgr/ml	۱۰ µgr/ml
۲٤H	۱۰۰	۷۷/۲٤ ±۱/۰۲	۶۹/۳۶±۰/۸	۵۶/۳۲±۰/۹۵	۵۲/۱۶±۰/۹۹	۵۰/۶٤±۱/۳٤
٤۸H	۱۰۰	۷۵/۲۵±۰/۹۶	۶٤/۵۵±۰/۹۲	۵٤/۳۹±۱/۰۵	۳۹/۶۹±۱/۰۸	۳۱/۷۷±۰/۹۱
۷۲H	۱۰۰	۷۲/۸٤±۱/۰۶	۵۸/۸۱±۱/۰۶	٤۹/۰۸±۱/۰۰	۳۲/۷٤±۱/۰۶	۲۷/۲۹±۰/۸۳

مقادیر به‌دست‌آمده، به‌صورت Mean±SD می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها درسطح $p< 0.05$معنادار در نظرگرفته‌شده‌است(ANOVA , Tukey testone way).

جدول۲: میانگین توان زیستی سلول‌های رده4T1 ۲٤، ٤۸ و ۷۲ساعت پس ازتیمار با دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی باروش MTT.

زمان	شاهد	غلظت				
		۱۰۰ µgr/ml	۲۰۰ µgr/ml	٤۰۰ µgr/ml	۸۰۰ µgr/ml	۱۰۰۰ µgr/ml
۲٤H	۱۰۰	۸۸/۵٤±۱/۰۹	۷۸/۱٤±۱/۱	۷۰/۲۶±۱/۱۲		٤۹/۸۱±۱/۰۵
٤۸H	۱۰۰	۷۱/٤۹±۱/۲٤	۶۷/۸۸±۱/۰۰	۵۸/۲۹±۰/۸۵		۲۹/۷۱±۰/۹
۷۲H	۱۰۰	۶۶/۷۳±۰/۹۲	۶۲/۵۵±۱/۰۶	۵۰/۷٤±۱/٤۵	۳۰/۵±۰/۸۶	۲۳/۶۸±۰/۸۶

مقادیر به‌دست‌آمده، به‌صورت Means ±SD می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p< 0.05$معنادار درنظرگرفته‌شده‌است(ANOVA , Tukey test one way).

جدول ۳: میانگین توان زیستی سلول‌های رده4T1 ۲٤، ٤۸ و ۷۲ساعت پس از تیمارهم زمان با دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی با تاکسول به روشMTT.

زمان		غلظت				
	شاهد	۱۰۰+۰/۰۰۱ μgr/ml	۲۰۰+۰/۰۱ μgr/ml	٤۰۰+۰/۱ μgr/ml	۸۰۰+۱ μgr/ml	۱۰۰۰+۱۰ μgr/ml
۲٤H	۱۰۰	۷۲/۷۹±۱/۵	۶۵/۱۳±۲/۰۱	۵۰/۸٤±۰/٤۳	٤۹/۱۹±۰/۹۸	٤۶/۵۷±۰/۸۶
٤۸H	۱۰۰	۶۰/۸۵±۰/۹۱	۵۱/۷۵±۰/۸۸	٤۵/۶۶±۰/۹۹	۲۸/۷۲±۱/۰۹	۲۵/۷۹±۱/۰۵
۷۲H	۱۰۰	۵۷/۲۹±۱/۱۱	٤۸/۳±۱/۱٤	۷۳/۳±۱/۱۳	۲۸/٤۵±۰/۸۷	۲٤/۶۵±۱/۰۶

مقادیر به‌دست‌آمده، به‌صورت Means ±SD می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها درسطح $p< 0.05$معنادار درنظرگرفته‌شده‌است(ANOVA , Tukey test one way).

جدول ٤: میانگین توان زیستی سلول‌های رده 4T1 ۲٤، ٤۸ و ۷۲ساعت پس ازتیمارهم زمان با دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی باتاکسول به روش تریپان بلو.

زمان		غلظت				
	شاهد	۱۰۰+۰/۰۰۱ μgr/ml	۲۰۰+۰/۰۱ μgr/ml	٤۰۰+۰/۱ μgr/ml	۸۰۰+۱ μgr/ml	۱۰۰۰+۱۰ μgr/ml
۲٤H	۹۸/۱۶±۰/۹۵	۶۶/۲۶±۱/۱۱	۵۳/۲۷±۰/۹٤	٤۹/۰۹±۱/۰۲	۳۶/۰۳±۰/۹۸	۲۶/۳۵±۱/۰۸
٤۸H	۹۸/۰۹±۱/۰۱	۵٤/۱٤±۱/۰۱	٤۹/۰۹±۱/۰۵	۲۹/۷۱±۰/۹۲	۲۵/۲±۰/۹٤	۱۸/۲±۱/۰۱
۷۲H	۷۶/۳۲±۱/۰٤	۵۲/۵٤±۱/۰۰	٤۱/۵۹±۱/۱۱	۲۸±۰/۹۹	۲۳±۱/۰۱	۱۸/۱۳±۰/۹٤

مقادیر به‌دست‌آمده، به‌صورتMeans ±SD می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها درسطح $p< 0.05$معنادار درنظرگرفته‌شده‌است(ANOVA , Tukey test one way).

جدول ٤ نشان‌داده‌شده‌است. مقایسه‌ی میانگین توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس ازگذشت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت، اختلاف معناداری میان تمام گروه‌های تیمارشده با دوزهای مختلف تاکسول، عصاره‌ی هیدروالکلی و عصاره‌ی هیدروالکلی/ تاکسول در هر دو روش نشان می-دهد. به‌گونه‌ای‌که با افزایش میزان دوز قابلیت حیات سلول‌ها کاهش معناداری پیدا می‌کند.

عکس شماره‌ی (۱) نشان می‌دهد که در رنگ-آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید سلول‌های زنده به رنگ آبی و سلول‌های مرده به رنگ قرمز دیده می‌شوند و با افزایش دوز، تعداد سلول‌های قرمز افزایش یافته که خود، نشان دهنده‌ی آپوپتوز ناشی از تأثیر عصاره‌ی هیدروالکلی می‌باشد.

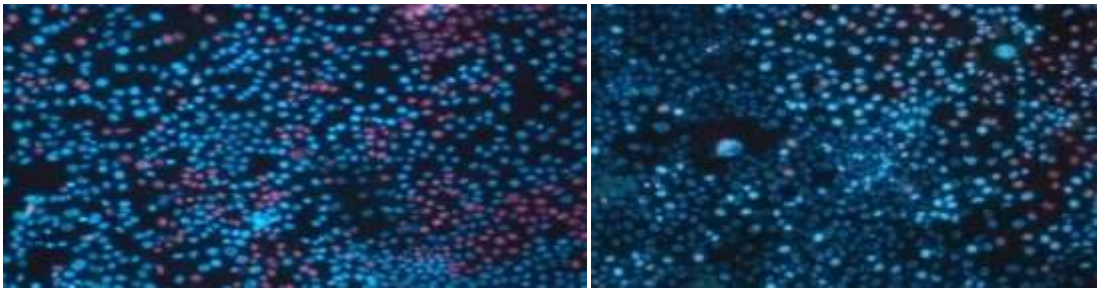
بحث

تاکسول، یک عامل آنتی میکروتوبول است که سرهم شدن و تشکیل میکروتوبول را از دیمرهای توبولین(واحد ساختمانی میکروتوبول ها) افزایش می دهد و با جلوگیری از دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها، موجب تثبیت آنها در سلول و درنهایت، ازبین‌رفتن توانایی سلول در استفاده از یک اسکلت سلولی انعطاف پذیر (که وجود آن دربسیاری از عملکردهای سلولی از قبیل تقسیم میتوز، حیاتی است) شده وبدین ترتیب، سلول پس از مدتی دچار وقفه در رشد شده و ازبین‌می‌رود (۱۳).

دراین پژوهش، بر اساس تعیین توان زیستی نتیجه‌گیری می‌شود که خاصیت ضد سرطانی عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی وابسته به دوز تیمار است. چون با افزایش دوز، میزان ترکیبات ضد سرطانی عصاره و لزوماً تاثیر ضد سرطانی آن به سلول ها افزایش می‌یابد.

نتایج به‌دست آمده بیانگر سایتوتوکسیسیتی تاکسول و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی بر رده‌ی سلول‌های سرطانی 4T1 موش بوده و با نتایج گزارش‌شده در مطالعه‌ی مشابه قبلی که بر روی سایر رده‌های سلولی انجام یافته، هم‌راستا می‌باشد.

براساس نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و MTT، کاهش توانایی حیات سلول‌های سرطانی رده‌ی 4T1 در تیمار با عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی، دیده‌شده که با نتایج حاصل از پژوهش Sertel و همکاران



الف ب

تصویر ۱: الف) عصاره‌ی هیدروالکلی ۸۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر- ب) عصاره‌ی هیدروالکلی ۸۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتروتاکسول ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر

در سال ۲۰۱۱ که عصاره‌ی آویشن باغی در شرایط آزمایشگاهی مانع از رشد کارسینوم سلول‌های سنگ‌فرشی حاصل از تومور سر و گردن در انسان می‌شود، هم-راستاست. فقط رده‌های سلولی مورد بررسی متفاوت است (۱٤).

در سال ۲۰۰۸، تحقیقات Rana نشان‌داده که عصاره‌ی آویشن، باعث بهبود پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و درنتیجه، کمک به جلوگیری ازاسترس اکسیداتیومی‌شود (۱۵). در پژوهشی که درسال ۲۰۰۸، توسط Joekim و همکارانش انجام شده، ردپای آنزیم های سیکلواکسیژناز و استرس اکسیداتیودرجریان دگرگونی‌های رشد و تمایز سلول، از جمله سرطان به تأئیدرسیده و مشخص‌شده که در عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن باغی ترکیباتی وجوددارند که آنزیم‌های مذکور را مهارمی‌کنند و موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند. ازطرفی، تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که آنزیم‌های سیکلواکسیژناز، در مکانیسم‌های سرطان‌زایی، نقش بسیار مهمی دارند . به-عنوان مثال، مهارآپوپتوزیس توسط تشدیدفعالیت آنزیم-های مذکور به‌اثبات رسیده است (۱٦،۱۷) .

درسال ۲۰۰۱، Liang و همکارانش دریافتند که فلاونوئیدهای موجود در آویشن، PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) را فعال‌کرده و به‌موجب آن بیان COX-2 را مهارمی‌نمایند(۱۸) .بنابراین احتمال‌داده‌می‌شود که عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی با مهار بیان Cox-2 موجب القاء آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی می‌شود.

در سال ۲۰۰۵، Diaz-cruz و همکارانش دریافتند که سیکلواکسیژنازها از طریق تولید پروستاگلاندین نوع E2 منجر به افزایش آنزیم آروماتاز می‌شوند که این آنزیم، قادراست آندروژن را به استروژن تبدیل کند(۱۹). بنابراین، احتمال می‌رود ترکیبات عصاره‌ی هیدورالکلی آویشن باغی با مهار آروماتاز توسط مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز، میزان استروژن راکاهش‌داده که این خود، باعث کمتر شدن رشد تومورخواهدشد.

اثرات درمانی و پیشگیری کننده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن باغی بر ضایعات پیش سرطانی و کارسینوم سلول‌های سنگ‌فرشی غده‌ی پروستات موش صحراییِ نژاد ویستار دیده شده که مربوط به تیمول وکارواکرول است (۲۰). بنابراین، در این تحقیق نیز می-توان گفت تیمول و کارواکرول عصاره‌ی هیدروالکلی، بر سایتوتوکسیتی تاکسول می‌افزایند.

بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها نشان‌داده که در سلول‌های تیمارشده توسط تاکسول و عصاره‌ی هیدروالکلی، تغییراتی مانند فروپاشی هسته‌ای و تشکیل اجسام آپپتوتیک و حباب‌زدگی غشاء مشاهده شده که وجود این تغییرات مورفولوژیک، یکی از پیامدهای رخداد آپپتوزیس در سلول‌ها می‌باشد. البته لازم به ذکر است که با اتکاء به این نتایج، صرفاً نمی‌توان وقوع آپپتوزیس در سلول‌ها را به‌اثبات رساند و برای اثبات این امر، انجام

تست‌های اختصاصی از قبیل الکتروفورز ژل آگارز (جهت تشخیص DNA Fragmentation) و تستTUNEL و بررسی مارکرهای آپپتوتیک توسط تکنیک فلوسایتومتری نیز نیاز است.

در نهایت، می‌توان چنین نتیجه‌گرفت که ترکیبات مؤثر موجود در عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی، مسؤول القاء مرگ سلولی (احتمالاً از نوع آپپتوزیس) در سلول‌های سرطانی رده 4T1 بوده و می‌بایست خواص ضدسرطانی و سایتوتوکسیک عصاره‌ی هیدروالکلی را ناشی از ترکیباتی از قبیل تیمول، کارواکرول و غیره دانست.

تشکر و قدردانی

در پایان از همه استادان گرانقدری که در انجام این پژوهش ما یاری کردند تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

1. Thompson. GhofranI M, Habibi L .Genetics in Medicine. Farda. 2009.[Persin]
2. Croce CM. Oncogenes and cancer .The New England journal of medicine. 2008 ; 358(5) : 502 – 11.
3. Elahi A, Goranorimi A, Basis Pathology ,Tehran, Arjmand ; 2008. [Persian]
4. 4--Mohaghegh FA , Hamta A, Shariatzadeh SM. The study of cancer incidence and cancer registration in markazi province between 2001-2006 and comparison with national statistics . Journal of Arak University of Medical Sciences ; 2008; 11(2) : 91 –7.[Persian]
5. Tian B , Wang Z, Zhao Y, Wang D, Li Y, Ma L, Li X, Li J, Xiao N, Tian J, Rodriguez R. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. Cancer Lett. 2008; 264(2): 299-308.
6. Ghasemi Dehkordi NA , Sajjadi SE, Ghannadi AR, Amenzadeh Y, Azadbakhet M, Asghari GHR ,Amin GHR, Haji Akhoundi A, Taleb AM. Iranian Herbal Plant Pharmacopoeia.2003;2(3):64.
7. Lixandru BE, Drăcea NO, Dragomirescu CC, Drăgulescu EC, Coldea IL, Anton L, Dobre E, Rovinaru C, Codita I. Antimicrobial activity of plant essential oils against bacterial and fungal species involved in food poisoning and/or food decay. Roum Arch Microbiol Immunol. 2010; 69(4): 224-30.
8. Vigo E, Cepeda A, Gualillo O, Perez-Fernandez R. In-vitro anti-inflammatory effect of Eucalyptus globulus and Thymus vulgaris: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. J Pharm Pharmacol. 2004; 56(2): 257-63.
9. Keeforer– Ring K, Thompson JD, Linhart YB. Beyond six scents: defining a seventh Thymus vulgaris chemotype new to southern France by ethanol extraction. Flavour and Fragrance Journal. 2009; 24(30): 117-22.
10. Stoddart MJ. Methods and Protocols in molecular Biology .(Estimation of cell number Based on Metabolic Activity:The MTT Assay**).** 2011; 740.
11. Stoddart MJ. Methods and Protocols in molecular Biology. 2011; 74(2).
12. sadeghi H. BioassayTechniques. kankash. Isfahan medical university. 2010: 66-7.[persian]
13. Depinho RA , Devita VT , Weinberg RA, Devita H. Rosenbergs cancer Principle & Practice of oncology 6th edition , Kansas city , ippincott William s & Wilkin s company. 2001 ; 43.
14. Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T. Cytotoxicity of Thymus vulgaris essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. Anticancer Res. 2011; 31(1): 81-7.
15. Rana P, Soni G. Antioxidantpotential of thyme extract: alleviation of Nnitrosodiethylamine - in duced oxidative stress. Hum Exp Toxicol. 2008. 27(3): 215- 21.
16. Dubios RN, Abramson SB, crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte L, Lipsky PE . Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 1998; 12(12): 1063-73.
17. Joekim H, Chung JH, Lee SH, Jung YS, Moon CH, Baik EJ. Involvement of endogenous prostaglandin- f2α on kainic acid– induced seizureactivity through fp receptor: the mechanism of proconvulsant effects of COX-2 inhibitors. Brain Res. 2008; 1193: 153-61.
18. Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-shiau SY. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator– activated receptor –gamma by flavonoids in mouse macrophages . FEBS Lett. 2001 ; 496(1): 12-8.
19. Diaz-Cruz ES, Shapiro CL, Brueggemeier RW. Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression

and activity in breast cancer cells. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(5): 2563-70.
20. Singh B, Lucci A. Role of cycloxygenase-2 in breast cancer. Surg Res. 2002; 108: 173-9.

The study of Thymus vulgaris Cytotoxicity effects on breast cancer cell's line

Ahmad Hamta
Assistant Professer of Molecular Genetics , Biology Department, Faculty of Science , Univercity of Arak, Arak, Iran.

Safiyeh Ghazaghi
Master of scienece in Genetic, Department of Biology , Faculty of Science, Univercity of Arak, Arak, Iran.

Received:03/01/2014**, Revised:**19/02/2014**, Accepted:**08/03/2014

Corresponding Author:
Arak, University of medical scienc, Biology Department,
Safieh Ghazaghi
Email:ghazaghisafieh@yahoo.com

Abstract

Background: Breast Cancer is the most common cancer in the Iranian women. Fortunately, it is a type of preventable and discernible cancer. The hydroethanolic extract of the leaves and flowered twigs of Thymu vulgaris contain various ingrediants in which the Thymol and Carvacrol are the most important of them. The effects of this anti-cancer in this extract are attributed significantly to these ingrediants . The objective of this research is to study the comparison of the efficiency of hydroethanolic extract and taxol on 4T1 line cells and their effects rate on the induction of apoptosis in cancer cells.

Materials and Methods: In this research, 4T1 line cells were bought from Tehran's Pasteur institute and the hydroethanolic extract is provided by the Soxhlet's method. Therefore, We obtained Cytotoxicity five different doses of the extract and five different doses of Taxol in 24, 48 and 72 hours and studied the viability of cells by the MTT and Tripan blue methods. Also, in this research the morphologic changes are done by the Hoechst and Propidiumi odied coloring methods.

Results: Extract and taxol-treated cells at different times have indicated distinct differences and dose-related results. Therefore, simultaneous treatment with the extract in comparison with taxol and taxol-treated cell extract can destroy more cells.

Conclusion: The hydroethanolic extract can increase the cytotoxicity Taxol, Thus it maybe be effective in breast cancer remedy and probably by apoptosis Induction may cause cells death.

Keywords: *1- Breast cancer 2- Taxol 3- Thymus vulgaris 4- Cytotoxicity*