بررسی تاثیر عصاره گیاه دافنه ماکروناتا بر فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا و گیرنده‌های آن بر مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت

مهدی هدایتی Ph.D.[☆♦]، راضیه یزدانپرست Ph.D.[☆]، فریدون عزیزی M.D.[☆]

☆ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی – بیوفیزیک

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۷۶۳-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم

پست الکترونیک: Email: hedayati@erc.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱/۱۵، پذیرش مقاله: ۸۴/۷/۱۵

* **هدف:** بررسی تاثیر عصاره گیاه دافنه ماکروناتا بر رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا و تعداد گیرنده‌های این فاکتور بر روی مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت

* **مواد و روش‌ها:** توسط دی متیل بنزآنتراسن (DMBA) تومور پستان در رت‌های ماده ایجاد شد. تاثیر خوراکی عصاره دافنه ماکروناتا بر کاهش حجم و حذف تومورهای مذکور بررسی شد. جهت جداسازی و خالص نمودن مونوسیت‌های انسانی از روش چسبندگی و گرادیان دانسیته بهره گرفته شد. اندازه‌گیری فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا توسط روش حساس الایزای بیوتین استرپتاویدین با و بدون استفاده از LPS صورت گرفت. بررسی تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا توسط نشان‌دارسازی رادیواکتیوی به کمک ید ۱۲۵ و دستگاه گاماکانتر انجام شد.

* **یافته‌ها:** تجویز خوراکی عصاره گیاه دافنه ماکروناتا به مدت ۲۰ روز متوالی سبب حذف و یا کاهش شدید اندازه تومور پستان در رت‌های آزمایشگاهی شد. این عصاره در مسیری وابسته به دوز سبب تحریک و افزایش ترشح فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا گردید. در مسیری وابسته به زمان در کمتر از ۲ ساعت عصاره دافنه ماکروناتا باعث تنظیم کاهشی شدید تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا بروی مونوسیت‌ها در محیط کشت گردید. در مقایسه داده‌های دو گروه از آزمون آماری t-student استفاده شد و اختلافات مورد بررسی با $p<0/001$ معنی‌دار بودند.

* **نتیجه گیری:** عصاره آب الکلی گیاه دافنه ماکروناتا سبب کاهش شدید تومورهای آدنوکارسینومای پستان رت می‌گردد. در بررسی مکانیزم عمل این عصاره معلوم شد که عصاره مذکور، سبب تحریک رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا توسط مونوسیت‌ها در محیط کشت می‌گردد و در ضمن این عصاره سبب تنظیم کاهشی تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا در سطح مونوسیت‌های انسانی می‌گردد.

کلیدواژگان: فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا، گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا، تاکسول، تومور پستان، دافنه ماکروناتا، تیمه لاسه

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هفتم، شماره ۳، پاییز ۸۴، صفحات ۱۵۷-۱۵۲

مقدمه

سابقه استفاده از جنس‌های مختلف گونه گیاه دافنه (رده تیمه لاسه) در درمان سرطان به ۲۰۰ سال پس از میلاد برمی‌گردد (۱، ۲، ۳، ۴). هرساله مقالات فراوانی از محققان کشورهای مختلف با توجه به شرایط اقلیمی کشورشان بر روی گونه‌های مختلف این گیاه گزارش می‌گردد. اثرات ضد میکروبی، ضد لوکمی، ضد التهابی، سقطهای ضروری، درمان نقرس و درمان انواع تومورها از جنس‌های مختلف این گیاه (دافنه جنوکاوا، دافنه اودورا، دافنه مزریوم، دافنه زرد، دافنه جینی‌دیوم، دافنه اولئویید) گزارش گردیده است (۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲). اما گزارشی در مورد کاربرد دارویی گونه و جنس ایرانی این گیاه یعنی دافنه (جنس) ماکروناتا (گونه) وجود ندارد. در گزارشات قبلی گروه تحقیقاتی ما، اثر عصاره جنس ایرانی این گیاه در مهار سنتز اسیدهای نوکلئیک و مهار چسبندگی سلولی گزارش گردید و لذا ایده اثرات ضد توموری و بررسی مکانیزم عمل آن شکل گرفت (۱۳، ۱۴). در این تحقیق اثر ضدتوموری و سیتوتوکسیسیتی عصاره آب/الکلی برگ‌های این گیاه بروی تومورهای القا شده پستان در رت مورد مطالعه قرار گرفت. پس از مشخص شدن اثرات قوی ضد توموری این عصاره، به منظور بررسی مکانیزم عمل آن، تاثیرعصاره این گیاه بر رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا و نیز تعداد گیرنده‌های این فاکتور بر سطح مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت در حضور و غیاب لیپوپلی‌ساکارید مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین در تمام مراحل از داروی تاکسول (داروی آنتی نئوپلاستیک طبیعی از پوست درخت سرخدار) جهت مقایسه استفاده شد. بر اساس گزارشات متعدد، تاکسول مانند لیپوپلی ساکارید، سبب افزایش رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا از مونوسیتها می‌گردد (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹). داده‌های حاصل از این تحقیق نیز اثرات مشابهی را برای عصاره دافنه ماکروناتا مطرح می‌سازد، با این تفاوت که این اثرات در حضور لیپوپلی ساکارید تقویت نمی‌گردد.

مواد و روش‌ها

فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا، لیپوپلی ساکارید سالمونلا

Archive of SID
www.SID.ir

تیفوموریم، آر پی ام آی ۱۶۴۰، پنی سیلین داروی تاکسول و سایر مواد شیمیایی از کمپانی سیگما خریداری شد. یدید سدیم رادیواکتیو (۱۲۵) از آژانس انرژی اتمی ایران و لوکوسیت‌های افراد سالم اهدا کننده خون از سازمان انتقال خون ایران تهیه گردید.

مواد گیاهی

گیاه دافنه ماکروناتا در انتهای فصل بهار از اطراف شهر کرمانشاه جمع‌آوری و در اتاق مخصوص خشک کردن گیاهان در دانشکده علوم دانشگاه تهران، به دور از تابش مستقیم نور خشک و نگهداری شد. سپس برگ‌ها از ساقه جدا و به صورت پودر در اتاق سرد نگهداری شد.

استخراج عصاره

هر ۵۰۰ گرم از پودر مذکور با سه مرتبه با مخلوط حجمی یک به یک آب/الکل استخراج شد. سپس تحت خلا و بعد با حرارت تغلیظ و در دمای ۲۰- نگهداری شد (۲۰، ۲۱، ۲۲).

تخمین دوز نیمه کشنده (LC_{50})

توان بیولوژیک عصاره مذکور بر اساس آزمایش مک‌مولین و همکاران (۲۳) بروی میگوی آب شور (Artemia Solina) انجام شد. به ویال‌های حاوی ۱۰ عدد میگو مقادیر مختلف عصاره مذکور به حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر از آب شور دریا، یک قطره مخمر خشک (۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) افزوده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقابل نور و دمای اتاق، درصد مرگ و میر در غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی تعیین و طبق رابطه ذیل اصلاح گردید.

٪death =([test-control]/control)× 100

دوز نیمه کشنده عصاره بر اساس روش فینی معین شد (۲۴).

حیوانات

رت‌های ماده (dawley Sprague) خریداری شده از حصارک تهران که آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند، از ۲۱ روزگی با آغشته کردن غذای آنها با ۲۰درصد روغن ذرت و خشک کردن در دمای ۳۷ درجه، تحت رژیم پرچرب قرار داشتند (۲۵، ۲۶). از ۵۰ روزگی با تجویز دی متیل بنزآنتراسن (۵ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر روغن ذرت) تومور پستان در رت‌ها القا شد. این عمل به مدت یک‌ماه و دوبار در هفته انجام می‌گرفت. جهت کاهش اثر مواد غذایی چرب بر جذب روده‌ای کارسینوژن ۱۲ ساعت قبل از تجویز کارسینوژن رژیم عادی غذایی اعمال شد. پس از ۱۲ ساعت از تجویز کارسینوژن، مجدد از رژیم پر چرب استفاده می‌شد. شرایط مشابهی برای گروه کنترل اعمال می‌شد. ابعاد تومورهای به وجود آمده در دو قطر عمود بر هم توسط ورنیه اندازه‌گیری می‌شد (۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰). رت‌های تومور دار از بقیه جدا و به دو گروه کنترل و آزمون تقسیم شدند. گروه آزمون ده هفته متوالی روزانه نیم میلی‌لیتر عصاره خوراکی و گروه کنترل به همان میزان آب مقطر دریافت می‌کردند.

ابعاد تومور در رت‌ها هر هفته اندازه‌گیری و حجم تومور از رابطه ذیل محاسبه می‌گردید:

$V=L.W^2/2$ حجم=V طول =L قطر=W

ید دارکردن فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا

نشان‌دارسازی رادیواکتیو فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا توسط ید ۱۲۵ با روش گرین وود و همکاران انجام شد (۳۱). در روش مذکور فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با یدید سدیم (۱۸/۵ ×10^6 بکرل) و کلرآمین‌تی (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر محلول سدیم متابی سولفیت (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به آن افزوده و پس از ۲ دقیقه ۱۰ میکرولیتر محلول یدید پتاسیم (۵۰ میکرو مولار در بافر تریس) به آن افزوده گردید. جداسازی مولکول نشان‌دار شده از سایر مولکول‌ها توسط سفادکس جی ۲۵ در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۶/۸، حاوی ۰/۲۵ درصد ژلاتین انجام شد.

جداسازی مونوسیت‌ها

جداسازی مونوسیت‌های انسانی از بسته‌های لوکوپک به دو روش چسبندگی سلولی (۳۲) و گرادیان دانسیته (۳۳) انجام گرفت. در روش اول سلول‌های چسبیده به ظروف پتری کمپانی نانک دومرتبه با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند و به صورت سوسپانسیون حاوی ۵ میلیون سلول در میلی‌لیتر به محیط کشت افزوده شدند. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در محیط کشت حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه، سلول‌های نچسبیده با ۳ تا ۴ بار شستشو با بافر سرد فسفات سالین از محیط خارج شدند. در نهایت سلول‌های مونوسیت چسبیده با کمک میله تفلونی و بافر فسفات سالین حاوی EDTA جدا و در محیط کشت با غلظت ۵۰۰ هزار سلول در میلی‌لیتر سوسپانسیون گردیدند. در روش گرادیان دانسیته از روش تغییر یافته المدیا و همکاران استفاده شد (۳۳). به طور خلاصه ابتدا از دانسیته ۱/۰۷۰ گرم در میلی‌لیتر فایکول و بعد ۱/۰۶۴ گرم در میلی‌لیتر استفاده شد. برای تهیه پرکول ایزواسموز از اختلاط یک حجم محلول ۱/۵ مولار نمک طعام و ۹ حجم پرکول استفاده شد. گرادیان‌های پرکول از اختلاط پرکول ایزواسمول با بافر فسفات سالین /سیترات ۱۳ میلی‌مولار به دست آمدند.

محیط کشت

در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای به صورت دوبل یک میلیون سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت (آر پی ام آی ۱۶۴۰، حاوی ۱۰۰ واحد بین المللی پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰درصد سرم جنین گوساله) افزوده شد. پس از ۲۰ ساعت مقادیر متفاوت عصاره گیاه دافنه ماکروناتا تا حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر به خانه‌های مختلف اضافه گردید و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد دی اکسیدکربن انکوبه شدند. البته برای سنجش گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده آلفا حداکثر ۲ ساعت انکوبه شدند. به منظور تحریک مونوسیتها از رقت

Archive of SID

www.SID.ir

۱:۱۰۰ عصاره غلیظ گیاه مذکور (معادل ۱ گرم پودر گیاه در میلی‌لیتر) به حجم‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکرولیتر یک‌بار در حضور ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید و یکبار در غیاب آن استفاده شد. این تحریک با اثر تحریک تاکسول، با غلظتهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار مقایسه شد.

تعیین غلظت فاکتور نکروز دهنده آلفا

میزان فاکتور نکروز دهنده آلفا در محلول فوقانی محیط کشت‌های مذکور با روش الایزای بیوتین – استرپتاویدین طراحی شده در آزمایشگاه پژوهشی مرکز تحقیقات غدد درون ریز دانشگاه شهید بهشتی (۳۴) اندازه گیری شد. به طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوقانی محیط کشت‌ها به هر چاهک کیت الایزا افزوده و یک ساعت در دمای اتاق بروی شیکر انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنتی‌بادی بیوتینیله بعد از شستشوی چاهک‌ها (بافر فسفات سالین حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰) به آنها افزوده و مجددا یک ساعت در دمای اتاق بروی شیکر انکوبه شد. بعد از این زمان و شستشوی مجدد ۱۰۰ میکرولیتر کنژوگه پراکسیداز – استرپتوآویدین به چاهک‌ها افزوده و نیم ساعت در شرایط فوق انکوبه شدند. در نهایت پس از شستشو و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر ترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه و نیم ساعت انکوباسیون توسط ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک واکنش متوقف و نتیجه آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. میزان فاکتور نکروز دهنده آلفا بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید.

اندازه گیری فاکتور نکروز دهنده آلفا

به خانه‌های مربوط به کنترل و آزمون (تحت تاثیر مقادیر مختلف عصاره گیاه)، حاوی مونوسیت‌ها، در فواصل زمانی مختلف ۱۰۰ میکرولیتر از فاکتور نکروز دهنده آلفای نشان‌دار شده با ید رادیواکتیو، افزوده و پس از چهارمرتبه شستشو با محیط کشت و جداسازی سلول‌ها با سانتریفوژ (با نیروی ۳۰۰ جی، برای ۵ دقیقه) رادیواکتیویته سلول‌ها که متناسب با تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده آلفا است و با دستگاه گاما کانتر شمارش شد.

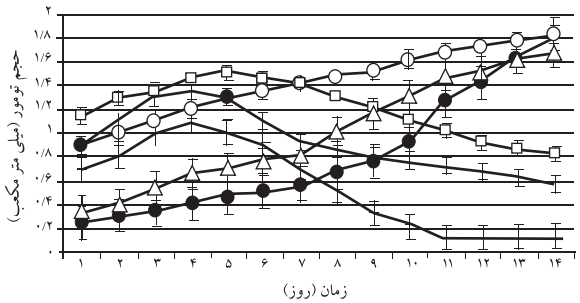
یافته‌ها

سنجش زیستی (بیواسی)

توان بیولوژیکی عصاره آب/الکلی دافنه ماکروناتا براساس تست میگو، دوز نیمه کشنده آن معادل ۰/۰۶۲ میلی‌گرم پودر برگ گیاه، و معادل ۰/۳ میلی‌گرم پودر ساقه گیاه در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

فعالیت ضد توموری

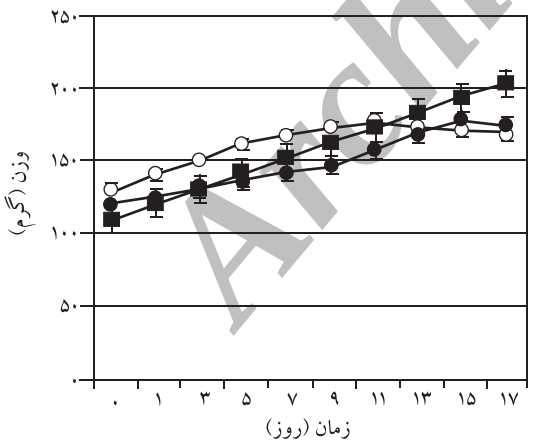
تومور پستان در ۶۲ درصد رت‌های تحت تاثیر دی متیل بنزآنتراسن به وجود آمد. به طور متوسط درهر رت ۲ تا ۳ تومور تشکیل شد. نوع تومور توسط پاتولوژیست کارسینوما و آدنوکارسینوما گزارش گردید. طبق نمودار ۱ اندازه سه تومور انتخاب شده در رت‌های کنترل در مدت ۱۷ هفته به بیش از ۱/۵ میلی‌متر مکعب رسید در حالی که اندازه تومورها در رتهای دریافت کننده عصاره این گیاه (روزانه ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره، معادل ۰/۵ گرم پودر برگ گیاه) در زمان فوق به شدت کاهش و در مواردی پس از ۱۲ هفته کاملا از بین رفت.



نمودار ۱: تاثیر تجویز خوراکی عصاره گیاه بر تومور پستان رت. رت‌های دریافت کننده روزانه نیم میلی‌لیتر آب مقطر (●–●، ○–○، Δ–Δ)
رت‌های دریافت‌کننده روزانه نیم میلی‌لیتر عصاره (■–■، □–□، —)

نتایج گزارش شده در نمودار ۲ نشان می‌دهد که مصرف آب و وزن رت‌ها در کلیه گروه‌ها مشابه بوده و تحت تاثیر عصاره گیاه تغییر نکرده است. از آنجایی که اثرات سمی خاصی با مصرف بلند مدت این عصاره مشاهده نشد و تاثیر قابل ملاحظه‌ای در کاهش و حتی از بین رفتن تومور پستان داشت، بررسی مکانیزم عمل این عصاره حایز اهمیت به نظر می‌رسید.

طبق گزارشات قبلی یکی از مسیرهای عملکرد داروی آنتی نئوپلاستیک تاکسول با منشا گیاهی افزایش رهایی فاکتور نکروز دهنده آلفا توسط مونوسیت‌ها و ماکروفاژها است. لذا تاثیر عصاره گیاه دافنه ماکروناتا با غلظت‌های مختلف و وابسته به زمان مورد مطالعه قرار گرفت.

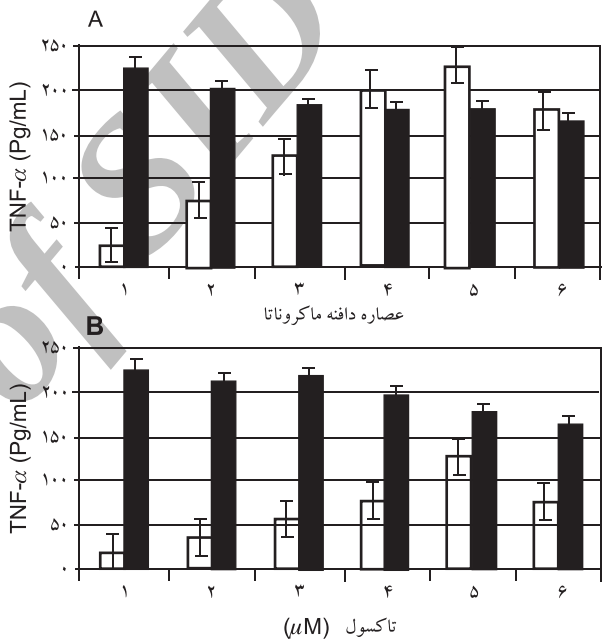


نمودار ۲: تاثیر عصاره آب الکلی گیاه بر وزن رت‌ها. (■–■)گروه کنترل سالم (○–○) گروه دریافت کننده کارسینوژن گروه دریافت‌کننده کارسینوژن و عصاره (●–●) اثر عصاره در ترشح فاکتور نکروز دهنده آلفا

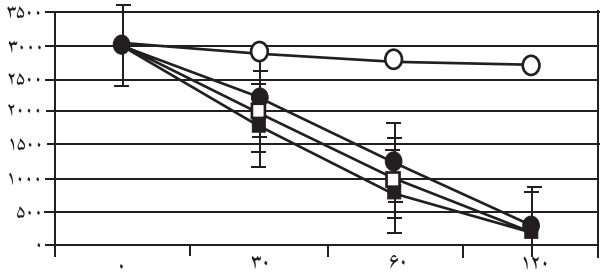
نمودار ۳ نشان می‌دهد که عصاره گیاه دافنه ماکروناتا به طریق وابسته به دوز، مانند تاکسول سبب افزایش ترشح فاکتور نکروز دهنده

Archive of SID
www.SID.ir

آلفا می‌گردد. البته افزودن لیپوپلی ساکارید (۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به عنوان محرک مونوسیت‌ها، این تحریک ترشح فاکتور نکروز دهنده آلفا را افزایش و یا کاهش نمی‌داد. افزایش ۱۶۰ میکرولیتر عصاره (معادل ۲۰ میلی‌گرم پودر گیاه در میلی‌لیتر) به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت تاثیری معادل ۱۰۰ نانوگرم لیپوپلی ساکارید در رهایی فاکتور نکروز دهنده آلفا از مونوسیت‌ها داشت. تاکسول به تنهایی، حتی تا دوز ۸۰ میکرومولار تاثیری معادل ۱۰۰ نانوگرم لیپوپلی ساکارید را در رهایی فاکتور نکروز دهنده آلفا نداشت. داده‌های این تحقیق نشان می‌دهد ، تاکسول و عصاره آب الکلی گیاه دافنه ماکروناتا هردو قادر به افزایش ترشح فاکتور نکروز دهنده آلفا از مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت می‌شوند.



نمودار ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره دافنه ماکروناتا (A) و غلظت‌های مختلف تاکسول (B) در رهایی TNF-α در حضور (■) و غیاب (□) ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از LPS بروی مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت.



نمودار ۴: اثرات وابسته زمان عصاره دافنه ماکروناتا بر تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا برمونوسیت‌های انسانی در محیط کشت. آب مقطر (○—○) ۲۰ میکرولیتر عصاره (●—●)، ۴۰ میکرولیتر عصاره (□—□)، ۸۰ میکرولیتر عصاره (■—■)

اثر عصاره بر تعداد گیرنده های فاکتور نکروز دهنده آلفا

تاثیر عصاره دافنه ماکروناتا بر تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده آلفا بروی مونوسیت‌ها در مقایسه با تاکسول بررسی شد. طبق شکل ۴ اتصال فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا به گیرنده‌هایش، یا به عبارتی تعداد این گیرنده‌ها در مسیری وابسته به زمان در طی ۲ ساعت به شدت کاهش می‌یابد. لذا این عصاره مانند تاکسول قادر به تنظیم کاهشی گیرنده‌های تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا است.

بحث

استفاده از گیاهان خانواده تیمه لاسه در درمان بیماری‌ها سابقه طولانی دارد (۲). جنس دافنه از مهمترین و کاربردی ترین جنس این گیاه محسوب می‌گردد. با توجه به شرایط اقلیمی کشورهای مختلف گونه‌های متفاوتی از این گیاه در دسترس محققان است و لذا گزارشات فراوانی از گونه‌های مختلف این گیاه منتشر می‌شود (۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰). گونه منحصر به فرد ایرانی این خانواده، دافنه ماکروناتا محسوب می‌گردد. نتایج منتشر شده توسط تیم تحقیقاتی ما اثرات مهاری عصاره آب الکلی دافنه ماکروناتا را در چسبندگی سلولی و کاهش سنتز اسیدهای نوکلئیک نشان داد (۱۳، ۱۴). لذا ایده اثرات ضد توموری این عصاره و اهمیت بررسی مکانیزم اثر آن شکل گرفت. با توجه به اهمیت سرطان پستان، بررسی بر روی این نوع سرطان در اولویت کارمان قرار گرفت. مطالعات اولیه در این تحقیق تاثیر مثبت عصاره آب الکلی برگ این گیاه را بر کاهش اندازه تومورهای آدنوکارسینومای پستان رت نشان داد. همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود حجم تومور در رتهای دریافت کننده عصاره گیاه در مقایسه با گروه کنترل (دریافت کننده آب مقطر) کاهش شدید و معنی‌داری داشته است. یکی از داروهایی با منشا گیاهی و موثر در درمان برخی از انواع سرطان‌ها، تاکسول است (۱۶، ۱۷، ۱۸). این ترکیب اولین بار از پوست درخت سرخدار استخراج شد. در بررسی مکانیزم مولکولی عملکرد این ترکیب دو مسیر اصلی گزارش شده است. در مسیر اول که به مسیر وابسته به چرخه سلولی معروف است، عملکرد این دارو به چرخه سلولی وابسته بوده و با تثبیت میکروتوبول‌ها مانع جداشدن دوک تقسیم می‌شود. اما درمسیر دوم که مسیر مستقل از چرخه سلولی است، عمدتا از طریق سایتوکاین‌ها عمل می‌کند. مهمترین سیتوکاین در این خصوص فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا است. این فاکتور عمدتا از ماکروفاژها و مونوسیت‌های ترشح می‌گردد (۱۶، ۱۸). البته این ترشح با محرک‌های ماکروفاژی مانند لیپوپلی‌ساکاریدها افزایش نیز می‌یابد. به دلیل در دسترس بودن امکانات، مطالعه مسیر مستقل از چرخه سلولی در خصوص نحوه اثر عصاره مذکور، مورد توجه محققین این طرح قرار گرفت. در بررسی عملکرد عصاره دافنه ماکروناتا، همان طور که در نمودار ۳ نشان داده شده است، تاثیر عصاره مذکور نیز حاکی از افزایش رهایی فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا توسط مونوسیت‌های جداشده انسانی در محیط کشت بود. مطابق نمودار ۳ این اثر با نحوه تاثیر داروی گیاهی

Archive of SID

www.SID.ir

تاکسول مشابه است، با این تفاوت که لیپوپلی‌ساکارید تاثیر عمده‌ای در افزایش این رهایی نداشته است. شاید پودر گیاه در طی مراحل آماده‌سازی و عصاره‌گیری به عوامل مشابهی آلوده شده و یا اصلا خود حاوی موادی با اثر مشابه بوده است.

سوال مطرح شده در طی آزمایشات مذکور این بود، در صورتی که منشا اصلی ترشح فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا مونوسیت‌ها و ماکروفاژها است و از طرفی تعداد قابل ملاحظه‌ای گیرنده این فاکتور نکروز دهنده بر روی خود مونوسیت‌ها وجود دارد، چرا افزایش رهایی آن توسط مونوسیت‌ها به خود مونوسیت‌ها آسیب نمی‌رساند؟ این سوال در خصوص نحوه اثر داروی گیاهی شناخته شده، تاکسول، نیز مطرح بوده و نتایج محققان حاکی از تنظیم کاهشی شدید گیرنده های فاکتور نکروز دهنده بروی مونوسیت‌ها و ماکروفاژها است (۱۶).

نتیجه‌گیری

همان طور که در نمودار ۴ نشان داده شده است، بررسی تعداد گیرنده‌های این فاکتور نکروز دهنده بروی مونوسیت‌ها پس از تاثیر دادن عصاره گیاه دافنه ماکروناتا، به کمک ردیابی لیگاند مربوطه با نشان‌دارسازی رادیو اکتیویته حاکی از تنظیم کاهشی شدید این گیرنده‌ها بوده است. به عبارتی با افزایش رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا، سلول‌های مولد یعنی مونوسیت‌ها، برای مکانیزم دفاعی، تعداد گیرنده‌های این فاکتور در سطح خود را به سرعت (کمتر از دو ساعت) و به شدت در محیط کشت کاهش می‌دهند. به طور خلاصه نتایج این تحقیق موثر بودن عصاره آب الکلی گیاه دافنه ماکروناتا را در کاهش حجم تومورهای آدنوکارسینوم پستان رت نشان داد و حداقل بخشی از مکانیزم عمل این عصاره از طریق تحریک ترشح فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا است.

در ضمن به منظور محافظت مونوسیت‌ها در برابر این تحریک ترشح فاکتور نکروز دهنده، تعداد گیرنده‌های آن بر سطح مونوسیت‌ها به سرعت کاهش می‌یابد. امید است با تخلیص و جداسازی ماده و یا مواد موثره این عصاره این گیاه، تعیین ساختمان مولکولی و بررسی عوارض جانبی آن بتوان بر مبنای گیاهان بومی کشور خودمان به داروهای موثر در درمان برخی سرطان‌ها دست یابیم.

Refrences

1. Abe F, Iwase Y, Yamauchi T, Kinjok K and Yaga S: Daphnane diterpenoids from the bark of Winstromia etusa. Phytochem 1977; 44: 643-646

2. Baba K, Takeuchi K, Hamaski F and Kozawa M: Chemical studies on the constituents of the Thimelaeceous plants. Thunb Chem Pharm Bull 1986; 34: 595-598

3. Kasai R, Lee K, Huang H: Antitumor agent 40.Genkawaphnin a potent anti-leukemic diterpene from Daphne genkawa. Phytochem 1981; 20: 2592-2595

4. Kupchan SM, Baxter R, Mezerin L: antileukemic principle isolated from Daphne mezerum. Science 1975; 187: 652-654

5. Larsen K: Medicinal, and poisonous plants. IV. Daphne mezereum. Nord Med 1962; 15; 67:227-228

6. Kupchan SM, Baxter R, Mezerein L: antileukemic principle isolated from Daphne mezereum L. Science 1975; 21: 187(4177): 652-653

7. Zhang XM, Wang CM, Cen YH, Huo HS, Ba JY, Liu ZT, Zhang XQ: Clinical observation and preliminary study of termination of early pregnancy by administration of yellow daphne, Shengzhi Yu Biyun 1984; 4(4): 42-46

8. Noro T, Oda Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S: Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of Daphne genkwa. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1983; 31(11): 3984-3987

9. Cottiglia F, Loy G, Garau D, Floris C, Casu M, Pompei R, Bonsignore L: Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of Daphne gnidium L. Phytomedicine. 2001; 8(4): 302-305

10. Yesilada E, Taninaka H, Takaishi Y, Honda G, Sezik E, Momota H, Ohmoto Y, Taki T: In vitro inhibitory effects of Daphne oleoides ssp. oleoides on inflammatory cytokines and activity-guided isolation of active constituents. Cytokine. 2001; 13(6): 359-364

11. Parish D: Daphne Parish: nursing freedom. Nursing. 1990; 4(24):19-20

12. Nikaido T, Ohmoto T, Sankawa U: Inhibitors of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase in Daphne genkwa Sieb. Chem Pharm Bull 1987; 35(2): 675-681

13. Mianabadi M, Yazdanparast R: Inhibition of substrate -tumor cell adhesion under the effect of gnidilatimonoein purified from Daphne mucronata. Am J Chin Med. 2004; 32(3): 369-376

14. Yazdanparast R, Sadeghi H: Nucleic acid synthesis in cancerous cells under the effect of gnidilatimonoein from Daphne mucronata. Life Sci 2004; 74(15):1869-1876

15. Beatler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A: Control of cachepsin (tumor necrosis factor) synthesis, mechanism of endotoxin reistance. Science 1986; 232: 977-980

16. Ding AH, Porteu F, Sanchez E, Nathan CE: Shared action of endotoxin and taxol on TNF-receptor and TNF

Archive of SID
www.SID.ir

release. Science 1990; 248: 370-373
17. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B: An endotoxine induced serum factor that cause necrosis tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 3665-3668
18. Allen JN, Moore SA, Wewers NW: Taxol enhance but not induced IL-1 beta and TNF-α production. Clin Res 1992; 40: 744
19. Nagahira A, Nagahira K, Murafuji H, Abe K, Magata K, Matsui M, Olkawa S: Identification of a novel inhibitor of LPS-induced TNF-α production with antiproliferative activity in monocytes/macrophages. Biochem Biophys Re Comm 2001; 281: 1030-1036
20. Mo Jianchu, Cheng Jia¡an: Advance on the research of the bioactivity of Daphne plants. Nat Prod Res Devel, 2003, 15(2): 167-170
21. Jianchu M, Jun Z, Wenxue W: Action of Daphne genkwa alcohol extract on the digestive enzymes of Abraxas Miranda and Pieris rapae. J Cent South Fores Univ. 2001; 21(1): 5-9
22. Vetrichelvan T, Jegadeesan M: Effect of alcohol extract of Achyranthes aspera Linn. On acute and subacute inflammation. Phytother Res. 2003; 17(1): 77-79
23. Meyer BN, Ferringne NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nicholas DE, Mclaughlin JL, Shrimp B: A convenient general bioassay for active plant constituents. Plant Medica 1982; 45: 31-34
24. Finney DJ: Probit analysis 3rd Ed. Cambridge University Press, Cambridge 1971
25. Clement IP: Ability of dietary fat to overcome the resistance of mature female rats to 7. 12-dimethylbenzanethracene induced mammary tumornecrosis. Cancer Res 1980; 40: 2785-2788
26. Hussey HJ, Tisdule MJ: Metabolism pharmacokinetic of the anti tumor agent 2, 3, 5 trimethyl-6- (3-pyridylmethyl) 1.4 benzoquinone. Brit J Cancer 1996; 74: 1379-1382
27. Hilakivi-Clarke L, Wright A, Lippman ME: DMBA-induced mammary tumor growth in rats exhibiting increased or decreased ability to cope with stress due to early postnatal handling or antidepressant treatment. Physiol Behav. 1993; 54(2): 229-236
28. Tsukidate K, Toida M, Sobue M, Fukatsu T, Nagasaka T, Nakashima N, Kawaguchi T, Takeuchi J: Immunohistochemical studies of DMBA-induced rat mammary tumors. Acta Pathol Jpn. 1988; 38(2): 129-139
29. Lahiri T, Lahiri P: Variability in response pattern of DMBA induced mammary tumors of Wistar rats. Neoplasm a. 1987; 34(5): 537-543
30. King MM, Pento JT, Magarian RA, Brueggemann G: The interaction of dietary fat and antiestrogen treatment on DMBA-induced mammary tumors in the rat. Nutr Cancer. 1985; 7(4): 239-249
31. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of 131-I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem 1963; 39: 114-118
32. Bunnett S and Berit S.N. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. J Leukoc Biol 1994; 56: 236-240
33. Almeida MC, Silva AC, Barral A, Netto MB: A method for human peripheral blood monocytes isolation. Mem Ins Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2000; 95(2): 221-223
34. Hedayati M, Yazdanparast R, Azizi F: Determination of human tumor necrosis factor alpha by a highly sensitive enzyme immunoassay. Biochem Biophys Res Comm 2001; 289: 295-298

Archive of SID

www.SID.ir