دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وچهارم–شماره ۱۲۵
آبان ۱۳۹۵

مقایسهٔ توکسیسیتهٔ فراوردهٔ گیاهی SIM5 و فراکشن‌های آن بر سلول‌های طبیعی در حال استراحت، فعال و سلول سرطانی

نویسندگان: رؤیا یارائی[1*]، محمد کمالی‌نژاد[2]، طیبه رجبیان[3]، مرضیه اقداردوست[1]، داود جمالی[1]

۱. مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد و گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: رؤیا یارایی **E-mail: ryaraee@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: بسیاری از داروهای ضدسرطانی، هم سلول‌های سالم و هم سلول‌های سرطانی را هدف می‌گیرند. باتوجه‌به اهمیت تکثیر سلولی در مراحل فعال‌شدن لنفوسیت‌ها، ترکیبات ضدسرطانی که بر سلول‌های نرمال در حال تکثیر اثر نامطلوب نداشته باشند، بسیار ارزشمند هستند. اثر توکسیک فراوردهٔ گیاهی SIM5 بر برخی سلول‌های سرطانی گزارش شده، ولی تأثیر آن بر سلول‌های طبیعیِ در حال تکثیر مشخص نیست. مطالعهٔ حاضر به‌منظور مقایسهٔ کامل‌تر اثر این فراورده و فراکشن‌های آن بر سلول‌های طبیعی در حال استراحت و در حال تکثیر و نیز ردهٔ سرطانی طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: ردهٔ سلولی BCL1 (سرطانی) و سلول‌های طحال موش (طبیعی در حال استراحت) کشت داده شدند. به نیمی از چاهک‌ها محرک (ConA یا LPS) اضافه شد (طبیعی در حال تکثیر) و به‌مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف SIM5 و یا فراکشن‌های آن (بر اساس وزن ملکولی تقریبی) مجاور شدند؛ سپس تست MTT انجام شد و میزان توکسیسیته و IC50 محاسبه گردید.

نتایج: بااینکه SIM5 اثر توکسیک قوی بر ردهٔ سرطانی BCL1 داشت (از ۲ تا ۰/۲ با IC50 حدود ۰/۴۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، ولی بر لنفوسیت‌های فعال‌شده اثر توکسیک نداشته، به‌علاوه توانست لنفوسیت‌های طبیعی در حال استراحت را فعال نماید. بهترین تأثیر ضدسرطانی در محدودهٔ وزن ملکولی ۳۰-۵۰ کیلودالتون (IC50 حدود ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) و بهترین اثر فعالیت سلولی در محدودهٔ ۱۰-۳۰ کیلودالتون مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: اثر فراوردهٔ گیاهی SIM5 بر سلول‌های سرطانی، طبیعیِ در حال استراحت و طبیعیِ در حال تکثیر متفاوت است. جست‌وجوی مکانیسم‌های احتمالی افتراق آن می‌تواند راهگشای استفاده از این فراورده به‌عنوان داروی ضدسرطانی باشد.

واژگان کلیدی: SIM5، سایتوتوکسیسیته، ردهٔ سلولی BCL1، لنفوسیت موش، فعالیت تکثیری.

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۷/۲۰
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۲۸

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

یکی از مهم‌ترین تفاوت‌های سلول‌های سرطانی با سلول‌های طبیعی، تکثیر بی‌رویهٔ آن‌ها می‌باشد (۲،۱). بسیاری از داروهای ضدسرطانی، تکثیر سلولی را هدف می‌گیرند؛ ولی الزاماً بین سلول‌های در حال تکثیر طبیعی (مثل لنفوسیت‌های فعال، سلول‌های بنیادی مغز استخوان یا سلول‌های اپی‌تلیال) و تکثیر سرطانی، تمایز جدی قائل نیستند، و لذا عوارض جانبی فراوانی ایجاد می‌کنند (۳). باید توجه داشت لنفوسیت‌ها که مهم‌ترین سلول‌های ایمنی اختصاصی هستند، به‌دنبال شناسایی آنتی‌ژن و فعال‌شدن، شروع به تکثیر شدید (و کنترل‌شده) می‌نمایند که لازمهٔ پاسخ ایمنی است (۵،٤)؛ درنتیجه مهار تکثیر سلولی موجب سرکوب پاسخ‌های ایمنی (ازجمله مقابله با سلول‌های توموری و سایر عوامل مهاجم) خواهد شد و روشن است که سرکوب سیستم ایمنی، خود می‌تواند گسترش تومور را به‌دنبال داشته باشد (٦)؛ لذا جست‌وجو برای یافتن داروهای ضدسرطانی که بر تکثیر طبیعی سلول‌های سیستم ایمنی اثر نامطلوب نداشته باشند، بسیار مفید است.

گیاهان دارویی که از قدیم پشتوانه‌ای برای درمان بیماری‌های مختلف انسان به‌شمار می‌رفته‌اند، منابع خوبی برای یافتن انواع ترکیبات مؤثر هستند و امروزه نیز جایگاه موردتوجهی در پزشکی جدید یافته و انواع ترکیبات گیاهی با قدرت تنظیم پاسخ‌های ایمنی و یا خاصیت ضدسرطانی گزارش شده‌اند (۱۱-۷). یافتن فراورده‌ای در بین گیاهان دارویی که علاوه بر خاصیت ضدسرطانی، مانعی برای پاسخ‌های ایمنی نباشد، بسیار مورد توجه است. قبلاً گزارش شده بود که فراوردهٔ گیاهی SIM5، اثر توکسیک قوی بر چند ردهٔ سرطانی مختلف انسان دارد؛ ولی تا دوزهایی بسیار بالاتر، اثر توکسیک بر لنفوسیت‌های سالم خون انسان ندارد (۱۲)؛ لذا این فراورده که جزء اصلی آن عصارهٔ گیاه مرزنجوش (Origanum vulgare L.) است، بالقوه می‌تواند کاندید خوبی در جهت هدف فوق باشد، چرا که دارای اثرات ضدسرطانی بدون تضعیف سیستم ایمنی است.

گیاه مرزنجوش بیشتر از جهت اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی (۱۷-۱۳) خود مورد بررسی قرار گرفته است و مطالعات محدودی نیز در سال‌های اخیر، درمورد اثرات ضدسرطانی آن انجام شده است. طی این مطالعات گزارش شده است که عصارهٔ O. syriacum (۱۸)، O. vulgare (۱۹) و O. dictamnus (۲۰) می‌توانند موجب مرگ‌ومیر رده‌های سلولی سرطانی در شرایط in vitro شوند. در یک مطالعهٔ جدید گزارش شده که O. majorana در شرایط in vitro اثرات مهاری بر عوامل مؤثر در متاستاز در ردهٔ سلولی سرطانی MDA-MB-231 داشته است (۲۱). نتایج مطالعهٔ ما نیز نشان داده بود که فراوردهٔ SIM5 به‌دست‌آمده از این گیاه دارای اثرات توکسیک قوی بر سلول‌های سرطانی بوده، ولی تا غلظت‌های چندین برابر، اثر سمی بر سلول‌های طبیعی ندارد (۱۲). اما ممکن است فقدان اثر سمی به این دلیل باشد که سلول‌های طبیعی در شرایط آزمایشگاهی، معمولاً در حال تکثیر نیستند؛ لذا این سؤال مطرح است که آیا این فراورده برای سلول طبیعی و در حال تکثیر نیز غیرسمی است یا خیر و به‌عبارتی آیا قادر به افتراق سلول‌های سرطانی و سلول‌های طبیعی (هر دو در حال تکثیر) هست؟

در این مطالعه، اثر توکسیک این فراورده بر سه نوع سلول، ردهٔ سلولی لنفومای موشی (ردهٔ BCL1) به‌عنوان سلول سرطانی، سلول‌های سالم جداشده از طحال موش به‌عنوان منبع لنفوسیت‌های در حال استراحت و همین سلول‌ها در وضعیت فعال و در حال تکثیر (با استفاده از محرک) به‌عنوان سلول طبیعی در حال تکثیر، مورد بررسی قرار گرفت و این اثر توکسیک در غلظت‌های مختلف با یک داروی ضدسرطانی رایج در درمان لنفوم نیز مقایسه گردید. از طرف دیگر، برای شناسایی جزء مؤثر در این فراورده، ترکیبات مختلف SIM5 بر اساس وزن ملکولی تقریبی به‌صورت فراکشن‌های مختلف جداسازی و تأثیر آن‌ها بر ردهٔ سرطانی و سلول طبیعی بررسی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های سرطانی

ردهٔ سلولی BCL1 (B cell lymphoma cell line) که منشأ آن موش‌های BALB/c هستند، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (NCBI) تهیه و در محیط RPMI-1640 (Gibco) همراه با ۱۰درصد FBS در انکوباتور با دمای ۳۷°C و ۵درصد CO_2 نگهداری و تکثیر شدند. برای انجام تست‌های مربوط به توکسیسیته، تعداد ۲×۱۰^{٤} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند.

سلول‌های سالم در حال استراحت

موش‌های BALB/c شش تا هشت‌هفته‌ای سالم، از آزمایشگاه حیوانات دانشکدهٔ پزشکی شاهد تهیه شدند. بعد از بیهوش‌کردن، طحال موش‌ها در شرایط استریل خارج شد و سلول‌های آن با تزریق نرمال سالین به داخل طحال و هم‌زمان فشردن طحال با پنس و تکرار این کار استخراج گردیدند. گلبول‌های قرمز موجود در سوسپانسیون سلولی با استفاده از محلول لیزکنندهٔ کلرید آمونیوم بافری‌شده با تریس (نسبت ۱ به ۹ از تریس ۰.۱۷ مولار و کلرید آمونیوم ۰.۱۶ مولار که pH آن با HCl روی ۷.۲ تنظیم شده باشد) حذف شدند. به‌طور خلاصه، به رسوب سلول‌ها پس از سانتریفوژ، ۲ میلی‌لیتر محلول لیزکننده اضافه گردید، پس از ۲ دقیقه حجم مساوی FBS اضافه و محلول حاصل سانتریفوژ شد؛ نهایتاً سلول‌ها با حذف محلول رویی و معلق‌کردن مجدد سلول‌ها در محیط تازه و شست‌وشوی مجدد، در RPMI 1640 حاوی ۱۰درصد FBS قرار گرفتند و با کمک لام نئوبار شمارش شدند. سپس تعداد ۲×۱۰^{٥} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد.

سلول‌های طبیعی در حال تکثیر

بخشی از سلول‌های طحالی به‌دست‌آمده در مرحلهٔ قبل که در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند (با شرایط مشابه)، در حضور محرک لیپوپلی‌ساکارید (LPS) یا کانکاناوالین A (ConA) (بسته به آزمایش) قرار گرفتند که محرک‌های رایج برای فعال‌کردن لنفوسیت‌های موشی و به‌دنبال آن تکثیر سلولی هستند.

تهیهٔ فراوردهٔ گیاهی و فراکشن‌های آن

گیاه مرزنجوش از فروشگاه گیاهان دارویی تهیه و توسط گیاه‌شناس شناسایی گردید. از نمونهٔ خردشدهٔ گیاه عصاره‌گیری شد و عصارهٔ تهیه‌شده نهایتاً خشک شده به پودر تبدیل شد. از پودر حاصل، محلولی به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و پس از عبوردادن از فیلتر ۰/۲ میکرومتر برای تهیهٔ رقت‌های موردنظر استفاده شد.

تهیهٔ فراکشن‌ها

برای فراکشن‌گیری از سیستم اولترافیلتراسیون آمیکون استفاده شد، محلول SIM5 با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطر، به‌طور متوالی، از چندین فیلتر با اندازه‌های ۱۰۰، ۵۰، ۳۰ و ۱۰ کیلودالتون عبور داده شد. در هر مرحله، ملکول‌های با وزن بالاتر که در بالای فیلتر باقی مانده و از فیلتر عبور نمی‌کردند به نام باقی‌مانده (R) نام‌گذاری شدند و مایع عبورکرده (F)، از فیلتر بعدی عبور داده شد و به‌این‌ترتیب فراکشن‌های R100، R50، R30، R10، R5 و F5 به‌دست آمد که هر فراکشن محدودهٔ وزن ملکولی تقریبی مشخصی داشت، به این صورت که فراکشن R100 با وزن ملکولی تقریبی بالای ۱۰۰ کیلودالتون و فراکشن R50 با وزن ملکولی تقریبی بین ۵۰– ۱۰۰ کیلودالتون، فراکشن R30 با وزن ملکولی تقریبی بین ۳۰–۵۰ کیلودالتون، فراکشن R10 با وزن ملکولی تقریبی بین ۱۰–۳۰ کیلودالتون، فراکشن R5 با وزن ملکولی تقریبی بین ۵–۱۰ کیلودالتون و فراکشن F5 با وزن ملکولی تقریبی کمتر از ۵ کیلودالتون می‌باشد. از رقت‌های هریک از فراکشن‌ها برای آزمایش استفاده شد و نهایتاً مقدار مادهٔ خشک موجود در فراکشن‌ها نیز اندازه‌گیری شد (جدول ۱) و غلظت مورداستفاده محاسبه گردید. میزان پروتئین موجود در هر فراکشن نیز تعیین شد.

سنجش پروتئین

جهت سنجش پروتئین از روش برادفورد طبق دستورالعمل کیت (Sigma, Germany) استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

طبق دستورالعمل کیت، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه (نمونهٔ اصلی و یا هریک از فراکشن‌ها) در چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و سپس ۲۵۰ میکرولیتر از معرف برادفورد به آن افزوده ۳۰ ثانیه ورتکس کرده و میزان جذب نوری در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر به‌وسیلهٔ دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. غلظت هر نمونه با استفاده از غلظت‌های استاندارد تهیه‌شده به‌دست آمد. جهت تهیهٔ استاندارد از پروتئین BSA غلظت‌های ۰/۱–۱/٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و جذب نوری آن‌ها نیز خوانده شد. مقادیر پروتئین SIM5 و فراکشن‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. محتوای پروتئینی (تست برادفورد) و مادهٔ خشک موجود در هر فراکشن SIM5

	SIM5	R100	R50	R30	R10	R5	F5
جذب (OD) در تست برادفورد	۰.۲٤۷	۰.۲۱۳	۰.۱۰۳	۰.۱۰۹	۰.۱٤٥	۰.۱۰۸	۰.۰٤٤
غلظت پروتئین (mg/ml)	۰.۳۳	۰.۲٦	۰.۰۹	۰.۰۹٥	۰.۱۷	۰.۰۹٤	۰
مادهٔ خشک (mg/ml)	۱۰	٦	٥.۳۳	۳.٦۷	٦.۳	ناچیز	ناچیز
نسبت پروتئین به مادهٔ خشک	۳.۳	٤.۳	۱.۷	۲.٦	۲.٦	-	-

تست MTT، توکسیسیته، IC50 و ایندکس فعال‌سازی

طرح کلی

سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه به‌مدت یک شب، برای تطبیق با محیط باقی‌مانده و سپس محیط رویی تعویض شده، محیط تازه و سایر مواد اضافه شدند. برای هر حالت ۵ تکرار (یعنی ۵ چاهک) در نظر گرفته شد. حالت‌های موردبررسی در این مطالعه که برای سلول‌ها اعم از ردهٔ سرطانی، سلول نرمال در حال استراحت و سلول نرمال در حال تکثیر (فعال‌شده) جداگانه انجام شده‌اند عبارت بودند از:

اثر SIM5 به‌تنهایی: از SIM5 در مقادیر ۰، ۰.۰۱، ۰.۰۵، ۰.۱، ۰.۵، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد (برای هریک از غلظت‌ها ۵ تکرار).

مقایسهٔ اثر توکسیک: وینکریستین (داروی ضدسرطانی) با غلظت‌های ۱ یا ۰.۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (برای هریک ۵ تکرار) و تریتون ۱۰۰ به‌عنوان مادهٔ توکسیک.

فعال‌سازی با دو محرک مختلف: محرک LPS (در غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌تنهایی یا همراه با SIM5 و همچنین محرک ConA (در غلظت نهایی ۱۲.۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌تنهایی یا همراه با SIM5 (هرکدام جداگانه ۵ تکرار) برای وادارکردن لنفوسیت‌ها به تکثیر استفاده شدند.

فراکشن‌ها برای تخمین محدودهٔ وزن ملکولی مواد مؤثر: رقت‌های ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰ و ۱/۵۰۰ هرکدام از فراکشن‌های R100، R50، R30، R10، R5، و F5 به‌طور جداگانه (برای هر رقت از هر فراکشن ۵ تکرار) در هر سه حالت سلولی مورد آزمایش قرار گرفتند.

تست MTT

پس از ٤۸ ساعت تست MTT انجام شده و میزان توکسیسیته مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، محلول MTT در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌اندازهٔ یک‌دهم حجم محیط کشت (۲۰ میکرولیتر) به چاهک‌ها اضافه شد و پس از گذشت ٤ ساعت، محیط رویی با ملایمت برداشته شد و کریستال‌های فورمازان تشکیل‌شده در ایزوپروپانول اسیدی (۰.۰٤ مولار HCl) حل شدند. سپس با استفاده از دستگاه الایزا ریدر، میزان جذب هر چاهک تعیین شد.

توکسیسیته

– با مقایسهٔ میزان جذب به‌دست‌آمده در گروه کنترل و هریک از گروه‌های دیگر، میزان توکسیسیته (درصد در مقایسه با کنترل) تعیین شد.

– IC50 غلظت ایجادکنندهٔ ۵۰درصد مرگ‌ومیر (IC50) نیز با محاسبه بر اساس توکسیسیته در غلظت‌های

Archive of SID

www.SID.ir

مختلف و رسم نمودار و تعیین نقطهٔ ۵۰درصد مشخص گردید.

ایندکس فعالیت

براساس جذب‌های به‌دست‌آمده و با استفاده از فرمول زیر ایندکس فعال‌سازی سلول محاسبه شد.

$$\text{ایندکس فعالیت} = \frac{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های کنترل}}{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های تست}}$$

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزارهای Excell، Prism و G-instat انجام شد (آزمون‌های ANOVA و تست‌های تکمیلی) و مقادیر p کمتر از ۰.۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

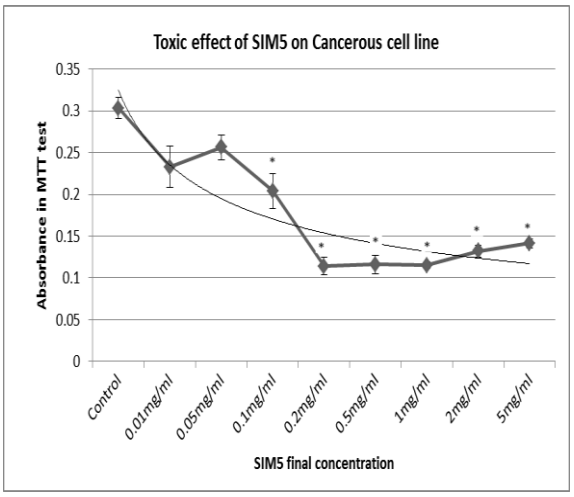
بخش اول نتایج به مقایسهٔ اثر SIM5 بر سلول سرطانی، طبیعی در حال استراحت و طبیعی در حال تکثیر و مقایسه با داروها یا محرک‌ها اختصاص دارد و در بخش دوم اثر فراکشن‌ها ارائه می‌شود.

بخش اول

الف. اثر توکسیک SIM5 روی سلول سرطانی (BCL1) و مقایسه با داروی وینکریستین

اثر غلظت‌های مختلف SIM5 (۰.۰۱–۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر ردهٔ سلولی سرطانی BCL1 با تست MTT (که شاخصی از فعالیت حیاتی سلول است) سنجیده شد. کاهش جذب در این تست نشان‌دهندهٔ کاهش فعالیت حیاتی سلول یا آسیب سلولی است. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، فعالیت حیاتی سلول‌های سرطانی در غلظت ۰.۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5، کاهش شدید و معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (بیش از ۳۰درصد کاهش) و در غلظت‌های بالاتر تا بیش از ۶۰درصد کاهش مشاهده می‌شود.

براساس این نمودار IC50 برابر ۰.٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است.



شکل ۱. اثر توکسیک SIM5 بر ردهٔ سلولی BCL1.

سلول‌ها به‌تعداد ۲×۱۰^{٤} به هر چاهک اضافه شدند و غلظت‌های مختلف SIM5 (۵ چاهک به‌ازای هر حالت) به آن‌ها اضافه شد و بعد از ٤٨ ساعت تست MTT انجام شد. داده‌های میانگین و انحراف معیار جذب در این تست در نمودار ارائه شده است و ستاره نشان‌دهندهٔ معناداربودن ازنظر آماری می‌باشد ($p<0.05$). خط روند نیز در شکل دیده می‌شود.

اثر توکسیک SIM5 روی سلول سرطانی با اثر توکسیک وینکریستین (یکی از داروهای رایج در درمان لنفوم) و همچنین تریتون به‌عنوان مادهٔ توکسیک مقایسه شد و همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود، میزان توکسیسیتهٔ تریتون حدود ٦٧درصد و وینکریستین ٤٣درصد است و SIM5 در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر میزان توکسیسیته نزدیک به تریتون بر سلول سرطانی دارد. اثر توکسیک در غلظت ۰.۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر SIM5 مشاهده نشد.

اضافه‌کردن هم‌زمان SIM5 و وینکریستین، نزدیک به ۵۰درصد توکسیسیته ایجاد کرد که نسبت به وینکریستین به‌تنهایی (٤٣درصد) ازنظر آماری معنادار نبود.

Archive of SID

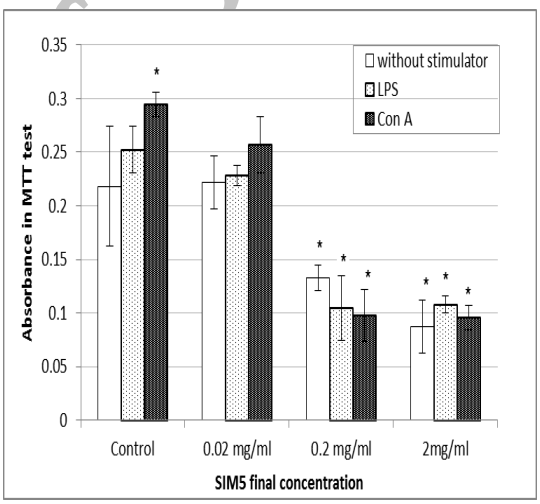
www.SID.ir

جدول ۲. مقایسهٔ اثر SIM5، تریتون و وینکریستین بر ردهٔ سرطانی BCL1

	Control	Triton 100	SIM5 (mg/ml)			Vincristine (0.5 mg/ml)	Vincristine (0.5) + SIM5 (0.2)
			0.02	0.2	2		
Toxicity (%)	۰	٦٦.٧	-۲.۸	۲۸.٦	٦۰.۰	٤۳.۲	٤۹.٤
P value *		۰.۰۰٥	NS**	۰.۰۱۸	۰.۰۰٥	۰.۰۰٤	۰.۰۰۲

* Compared with control
**NS= Not significant

در مرحلهٔ بعد، محرک‌های ConA و LPS به ردهٔ سرطانی اضافه شدند. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، غلظت‌های ۰.۲ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از SIM5 باعث مرگ‌ومیر سلول‌های سرطانی BCL1 شدند و حضور محرک‌های ConA و LPS تفاوت معنی‌داری بر این اثر نداشت.



شکل ۲. اثر توکسیک SIM5 بر ردهٔ سلولی BCL1 تحریک‌شده با محرک‌های ConA و LPS.

سلول‌ها به‌تعداد ۲×۱۰^{٤} به هر چاهک اضافه شدند و غلظت‌های مختلف SIM5، LPS (10µg/ml) یا ConA (12.5µg/ml) (۵ چاهک به‌ازای هر حالت) به آن‌ها اضافه شد و بعد از ٤٨ ساعت تست MTT انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار در نمودار ارائه شده است و ستاره نشان‌دهندهٔ معناداربودن ازنظر آماری در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد ($p<0.05$).

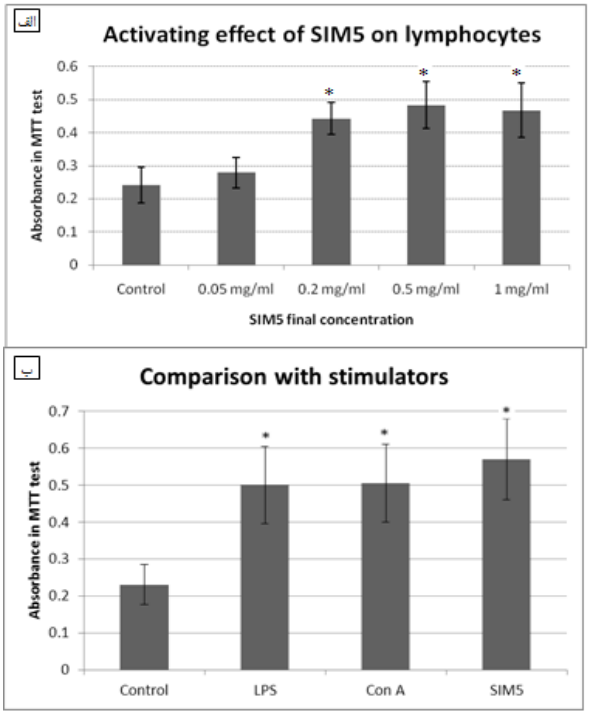
ب. اثر SIM5 بر لنفوسیت‌های نرمال طحال موش و مقایسه با LPS و ConA

به‌منظور بررسی اثر توکسیک SIM5 بر سلول‌های نرمال، از لنفوسیت‌های طحال موش استفاده شد و مشاهده گردید که SIM5 در غلظت‌های مختلف (از ۰.۰۵ تا ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نه‌تنها اثر توکسیک بر لنفوسیت‌های نرمال موش ندارد، بلکه می‌تواند موجب تحریک و افزایش فعالیت آن‌ها نیز باشد. همان‌طور که در شکل ۳. (الف) دیده می‌شود، میزان فعالیت سلول‌ها در تست MTT در غلظت‌های ۰.۲، ۰.۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از SIM5، افزایش معنی‌داری تا حدود دو برابر بیشتر از حالت کنترل نشان می‌دهد (به‌ترتیب با $p<0.001$، $p<0.002$ و $p<0.001$) ولی غلظت ۰.۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تأثیری که ازنظر آماری معنی‌دار باشد نداشت و از طرف دیگر، در غلظت‌های بالا هم اثر توکسیک دیده نشد.

شکل ۳. (ب) اثر فعال‌کنندگی SIM5 (۰.۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را با محرک‌های رایج یعنی لیپوپلی‌ساکارید (LPS) و کانکاناوالین A (ConA) مقایسه می‌کند. هر سه محرک، در لنفوسیت‌های نرمال موجب افزایش فعالیت بسیار نزدیک به یکدیگر شدند، SIM5 فعالیت لنفوسیت‌های نرمال را حدود ۲.۵ برابر ($p<0.004$) بیش از کنترل کرد، LPS و ConA نیز حدود ۲.۲ برابر افزایش نسبت به کنترل (به‌ترتیب $p<0.002$ و $p<0.009$) نشان دادند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. (الف) اثر SIM5 بر لنفوسیت‌های نرمال موش.

سلول‌ها به‌تعداد ۲×۱۰۵ به هر چاهک اضافه شدند و غلظت‌های مختلف SIM5 (۵ چاهک به‌ازای هر حالت) به آن‌ها اضافه شد و بعد از ۴۸ ساعت، تست MTT انجام شد. (ب) مقایسهٔ فعال‌سازی SIM5 بر لنفوسیت‌های نرمال موش با LPS و ConA. SIM5 در غلظت 0.1mg/ml، LPS (10µg/ml) و ConA (12.5µg/ml) به سلول‌ها اضافه شدند (۵ چاهک به‌ازای هر حالت) و بعد از ۴۸ ساعت تست MTT انجام شد.

داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار در نمودار ارائه شده است و ستاره نشان‌دهندهٔ معناداربودن ازنظر آماری می‌باشد ($p<0.05$)

ج. اثر SIM5 بر لنفوسیت‌های در حال تکثیر

به‌منظور بررسی اثر SIM5 بر لنفوسیت‌های فعال (یا در حال تکثیر)، SIM5 به لنفوسیت‌های نرمال که محرک‌های LPS یا ConA فوق دریافت کرده بودند اضافه گردید که نتایج آن در جدول ۳ مشاهده می‌شود. SIM5 به‌تنهایی موجب افزایش فعالیت لنفوسیت‌های نرمال در مقایسه با کنترل شد (نزدیک به دو برابر) و اضافه‌کردن هم‌زمان محرک و SIM5 کاهشی در فعالیت سلول‌های در حال تکثیر ایجاد نکرد.

جدول ۳. اثر تحریکی SIM5 به‌تنهایی و همراه با محرک‌های رایج (فعال‌کنندهٔ تکثیر لنفوسیت‌ها)

	Control	SIM5 (0.1 mg/ml)	SIM5+ConA	SIM5+LPS
Mean ± SD (absorbance)	۰.۱۷۵ ±۰.۰۳۵	۰.۳۲٤±۰.۰۹۷	۰.۳۲٤±۰.۱۰٦	۰.۳۸۷±۰.۰٤٤
Fold increase	۱	۱.۸۵	۱.۸٦	۲.۲۲
P value (with control)	-	۰.۰۲۳	۰.۰۳۲	۰.۰۰۰
P value (with SIM5)		-	۰.۹۹۸	۰.۲۳٦

بخش دوم

فراکشن‌های SIM5

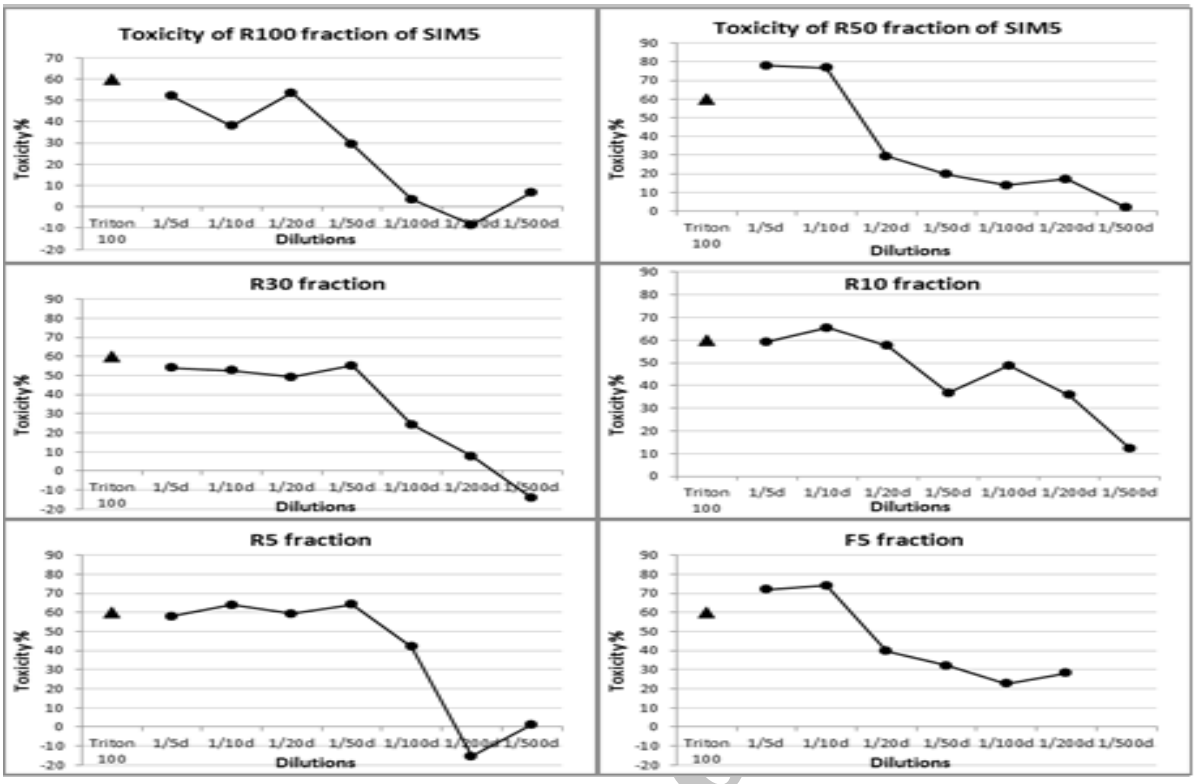
قسمت دوم نتایج مربوط به تأثیر فراکشن‌های SIM5 بر لنفوسیت‌های سرطانی یا لنفوسیت‌های نرمال است.

الف. اثر توکسیک فراکشن‌ها روی ردهٔ سلولی سرطانی

فراکشن‌های فراوردهٔ SIM5 بر اساس وزن ملکولی تقریبی تهیه شدند و هریک از فراکشن‌ها در رقت‌های مختلف به‌طور مجزا، با ردهٔ سلولی سرطانی BCL1 مجاور شدند (و همچنین تریتون ۱۰۰ به‌عنوان یک مادهٔ توکسیک برای مقایسه). میزان توکسیسیته بر اساس نتایج تست MTT محاسبه گردید (شکل ٤). بر اساس این نمودارها برخی فراکشن‌ها فقط در شرایطی که چندان رقیق نشده باشند، موجب مرگ سلول سرطانی می‌شوند، درحالی‌که برخی فراکشن‌ها حتی در رقت ۱:۱۰۰ نیز هنوز اثر توکسیک قابل‌مقایسه یا حتی بیشتر از تریتون بر سلول‌های سرطانی دارند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. اثر فراکشن‌های SIM5 (که بر اساس وزن ملکولی تقریبی تفکیک شده‌اند) بر ردهٔ سلولی BCL1.

سلول‌ها به‌تعداد ۲×۱۰^{٤} به هر چاهک اضافه شدند و رقت‌های مختلف تهیه‌شده از هر فراکشن و همچنین تریتون ۱۰۰ به چاهک‌های جداگانه اضافه شد (۵ چاهک به‌ازای هر حالت). بعد از ٤٨ ساعت تست MTT انجام شد و درصد توکسیسیته محاسبه گردید. میانگین توکسیسیته ۵ چاهک در نمودارها مشاهده می‌شود. فراکشن R100 حاوی ملکول‌های با وزن ملکولی تقریبی بیش از ۱۰۰ کیلودالتون، R50 با وزن ملکولی بین ۵۰-۱۰۰، R30 با وزن ملکولی بین ۳۰-۵۰، R10 با وزن ملکولی بین ۱۰-۳۰، R5 با وزن ملکولی بین ۵-۱۰ و F5 حاوی ملکول‌های کوچک‌تر باقی‌مانده است.

برای مقایسه، میزان IC50 به‌ازای رقت و مادهٔ خشک و محتوای پروتئینی هر فراکشن محاسبه گردید (جدول ٤). همان‌طور که مشاهده می‌شود کمترین IC50 در فراکشن‌های حاوی وزن ملکولی کمتر دیده می‌شود (R30 و R10). بر اساس مقدار مادهٔ خشک، R30 بیشترین اثر توکسیک را در کمترین مقدار دارا بوده است.

جدول ٤. IC50 برای اثر SIM5 بر سلول سرطانی برحسب میزان رقیق‌سازی و مادهٔ خشک و محتوای پروتئینی

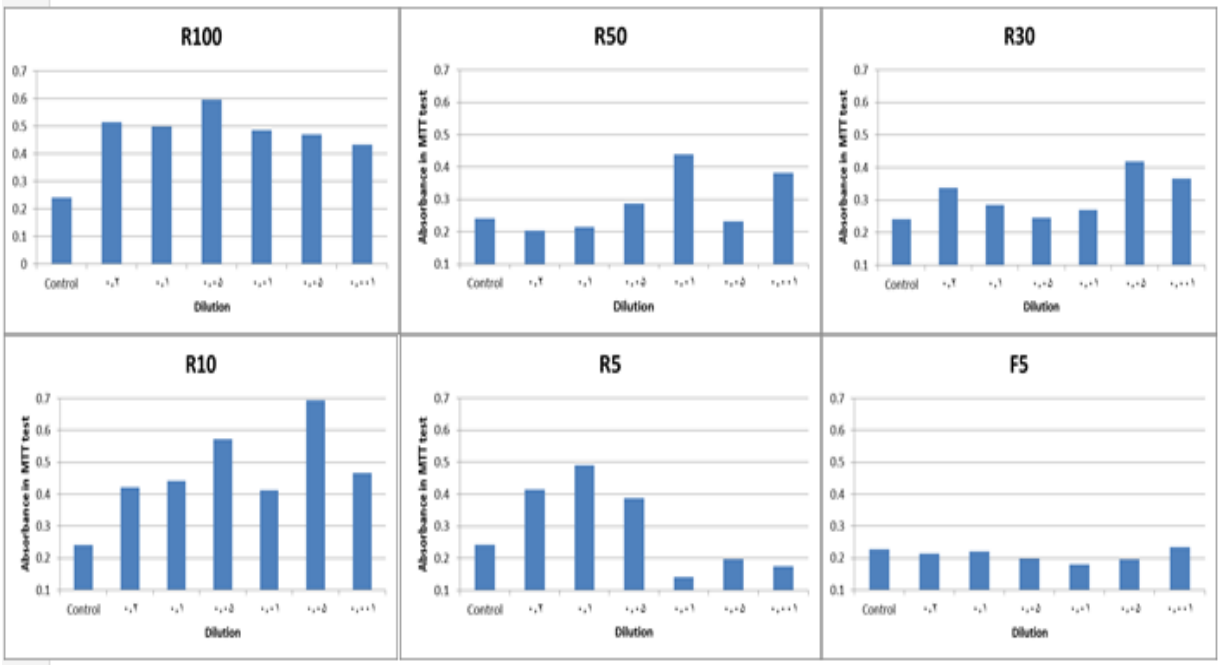
	IC50 (according to dilution)	IC50 mg/ml dry matter	IC50 µg/ml (according to protein content)
SIM5 (total)	-	۰.٤۱۵	۱۳۲
Fraction R100	$\frac{11}{100}$ یا ۰.۱۱۰	۰.٦٦٦	۷.۲۸
Fraction R50	$\frac{2.8}{100}$ یا ۰.۰۲۸	۰.۱٤۹	۱.۵۳
Fraction R30	$\frac{1.7}{100}$ یا ۰.۰۱۷	۰.۰٦۲	۱.۲۳
Fraction R10	$\frac{1.3}{100}$ یا ۰.۰۱۳	۰.۱۳۲	۲.۲۱
Fraction R5	$\frac{2.1}{100}$ یا ۰.۰۲۱	N.D.	۱.۹۷

Archive of SID

www.SID.ir

ب. اثر فعال‌کنندگی فراکشن‌ها بر لنفوسیت‌های نرمال

فراکشن‌ها در رقت‌های مختلف و به‌طور مجزا، به لنفوسیت‌های طحال موش اضافه شدند و تست MTT انجام شد (شکل ۵)، سپس نتایج به‌صورت ایندکس تحریکی محاسبه گردید (جدول ۵). همان‌طور که در نمودار و جدول مشاهده می‌شود، فراکشن R100 (که به فراوردهٔ اصلی نزدیک‌تر است) در شرایطی که خیلی رقیق نشده باشد (مثل رقت ۱ به ۵)، بیشترین ایندکس تحریکی را دارد. ولی در رقت‌های بالاتر مثل ۱ به ۲۰۰ قوی‌ترین اثر در فراکشن R10 دیده می‌شود. در سایر فراکشن‌ها تحریک سلولی کمتر است و از طرف دیگر، توکسیسیتهٔ قابل‌توجهی که ازنظر آماری معنی‌دار باشد مشاهده نمی‌شود.



شکل ۵. اثر فراکشن‌های SIM5 (که بر اساس وزن ملکولی تقریبی تفکیک شده‌اند) بر لنفوسیت‌های نرمال موش.

سلول‌ها به‌تعداد ۲×۱۰^{۵} به هر چاهک اضافه شدند و رقت‌های مختلف تهیه‌شده از هر فراکشن به چاهک‌های جداگانه اضافه شد (۵ چاهک به‌ازای هر حالت). بعد از ۴۸ ساعت تست MTT انجام شد و درصد توکسیسیته محاسبه گردید. میانگین توکسیسیتهٔ ۵ چاهک در نمودارها مشاهده می‌شود. فراکشن R100 حاوی ملکول‌های با وزن ملکولی تقریبی بیش از ۱۰۰ کیلودالتون، R50 با وزن ملکولی بین ۵۰–۱۰۰، R30 با وزن ملکولی بین ۳۰–۵۰، R10 با وزن ملکولی بین ۱۰–۳۰، R5 با وزن ملکولی بین ۵–۱۰ و F5 حاوی ملکول‌های کوچک‌تر باقی‌مانده است.

جدول ۵. میزان فعال‌سازی (ایندکس تحریکی) لنفوسیت‌های طبیعی توسط فراکشن‌های SIM5

Fraction / Dilution	R100	R50	R30	R10	R5	F5
0.2	۲.۱۳	۰.۸٤	۱.٤۰	۱.۷۵	۱.۷۱	۰.۹٤
0.1	۲.۰٦	۰.۸۹	۱.۱۸	۱.۸۲	۲.۰۳	۰.۹۷
0.05	۲.٤٦	۱.۱۹	۱.۰۲	۲.۳٦	۱.٦۱	۰.۸۷
0.01	۲.۰۰	۱.۸۱	۱.۱۲	۱.۷۱	۰.۵۹	۰.۸۰
0.005	۱.۹۵	۰.۹٦	۱.۷۳	۲.۸۷	۰.۸۱	۰.۸٦
0.002	۱.۷۹	۱.۵۸	۱.۵۱	۱.۹٤	۰.۷۲	۱.۰۳

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

داروهای توکسیک زیادی می‌توان یافت که قادر به کشتن سلول سرطانی (در این تحقیق، لنفوسیت‌های سرطانی) باشند، ولی در کنار آن عوارض شدیدی هم برای سلول‌های سالم، به‌ویژه سلول‌های سالم در حال تکثیر در بدن خواهند داشت. بسیاری از مطالعات in vitro درمورد داروهای ضدسرطانی، اثر توکسیک آن‌ها بر سلول طبیعی را نیز مورد مطالعه قرار می‌دهند؛ ولی معمولاً این سلول‌های در حال تکثیر فراوان نیستند. ازآنجاکه لنفوسیت‌ها متعاقب شناسایی آنتی‌ژن و فعال‌شدن تکثیر می‌شوند، بنابراین حتی دارویی که بر لنفوسیت سالم در حال استراحت اثر توکسیک ندارد ممکن است بر لنفوسیت فعال‌شده (یعنی در حال تکثیر) اثر سمی داشته باشد و لذا برای بدن خطرناک باشد؛ چرا که درست بر آن دسته از سلول‌های ایمنی اثر گذاشته است که در حال حفاظت بدن از عوامل مهاجم و بیماری‌زا و مقابله با سرطان هستند. لذا در بخش اول این مطالعه، اثر SIM5 بر ردهٔ سرطانی و سلول سالم، به‌ویژه تأثیر آن بر لنفوسیت‌های سالمی که در حال تکثیر هستند مطالعه شد. ردهٔ سلول سرطانی انتخاب‌شده در این مطالعه یعنی BCL1، منشأ لنفوسیتی داشته از موش نژاد BALB/c جدا شده است و لذا لنفوسیت‌های موش سالم از همین نژاد به‌عنوان کنترل در کنار این ردهٔ سلولی قرار گرفتند.

اثر توکسیک SIM5 بر سلول‌های سرطانی تا غلظت ۰.۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌خوبی دیده می‌شود (نمودار ۱) و IC50 در مطالعهٔ اولیه حدود ۰.۴۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر یا ٤١٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد؛ ولی درمورد سلول‌های سالم (لنفوسیت‌های طحال) تا غلظت ده برابر بیشتر (یعنی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نه‌تنها هیچ اثر توکسیکی دیده نشد، بلکه افزایش فعالیت و تکثیر آن‌ها نیز روی داد (نمودار ۳). ازآنجاکه در غلظت‌های استفاده‌شده، مرگ‌ومیری در سلول‌های سالم روی نداد، لذا IC50 (یعنی غلظت مناسب برای ۵۰درصد مرگ‌ومیر سلولی) برای سلول‌های سالم نیز وجود ندارد (باتوجه‌به افزایش فعالیت، مقدار آن منفی شده است). به‌نظر می‌رسد SIM5 علاوه بر اثر سمی بر سلول سرطانی، دارای قدرت تقویت سلول‌های ایمنی نیز هست.

در اکثر مطالعات، مادهٔ موردبررسی اثر توکسیک قوی بر هر دو سلول سرطانی و غیرسرطانی دارد (۲۲) و فقط در برخی موارد امکان تمایز نسبی بین این دو (سلول سرطانی و غیرسرطانی) گزارش شده است. در مطالعه‌ای (۲۳) درمورد اثر ضدسرطانی سیاه‌دانه مشاهده شد که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موجب کشتن ۹۲درصد از سلول‌های سرطانی و در غلظت ۱.۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موجب مرگ‌ومیر ۸۹درصد از سلول‌های غیرسرطانی (L929) می‌گردد. لذا حداقل در شرایط in vitro مرگ‌ومیر سلول‌های سالم بسیار بالاست. مطالعهٔ مشابهی درمورد گیاه حرا (۲٤) انجام شده است و IC50 را برای سلول‌های سرطانی حدود ٤٨١ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره به‌دست آورده‌اند که به یافته‌های ما نزدیک است (غلظت ٤١٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر SIM5). در این مطالعه IC50 برای سلول‌های غیرسرطانی حدوداً دو برابر بیشتر از سلول‌های سرطانی است (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) که در مقایسه با SIM5 که حتی تا غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز اثر توکسیک بر سلول سالم نداشت می‌تواند این احتمال را مطرح کند که قدرت تمایز SIM5 بین سلول سرطانی و غیرسرطانی نسبتاً بهتر است. مطالعهٔ دیگر مربوط به عصارهٔ تام زعفران است که این عصاره درمورد سلول سرطانی IC50 حدود ٤٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر (نزدیک به یافته‌های ما) دارد و اثر توکسیک بر سلول غیرسرطانی نیز تا غلظت ٦٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده نشد و IC50 برای سلول‌های سالم بالاتر از ۱۰۰۰ می‌باشد (۲۵). درمجموع می‌توان گفت SIM5 در مقایسه با سایر فراورده‌های گزارش‌شده، دارای قدرت تمایز بسیار خوبی برای افتراق بین سلول سالم و سرطانی است.

Archive of SID

www.SID.ir

ازآنجاکه تقویت فعالیت سلول‌های ایمنی توسط SIM5 مشاهده شد، این توانایی با محرک‌های مشهور و استاندارد مقایسه شد. همان‌طور که در نمودار ۵ دیده می‌شود، هرکدام از دو محرک LPS و ConA موجب افزایش فعالیت لنفوسیت‌ها تا حدود دو برابر شدند و SIM5 نیز در غلظت ۰.۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش فعالیت لنفوسیت‌ها تا حدود ۲.۷ برابر شده است. لذا علاوه بر اثر ضدسرطانی می‌تواند به‌عنوان یک ایمونومدولاتور نیز مورد توجه قرار بگیرد.

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، سؤال مهم این تحقیق این است که اثر این فراورده بر لنفوسیت در حال تکثیر چگونه است؟ به این منظور لنفوسیت‌های سالم در مجاورت دو محرک عمومی و رایج لنفوسیت‌ها یعنی LPS و ConA قرار گرفتند تا هم‌زمان با فعال‌شدن و آغاز به تکثیر، اثر SIM5 بر آن‌ها بررسی شود. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد (جدول ۳)، محرک‌های فوق موجب افزایش تکثیر و فعال‌شدن سلول‌ها می‌شوند و حضور SIM5 هیچ‌گونه تأثیر منفی بر این فعالیت ندارد؛ لذا می‌توان نتیجه گرفت که برخلاف بسیاری از داروهای ضدسرطان که باعث مهار تکثیر لنفوسیت‌ها و درنتیجه سرکوب ایمنی می‌شوند، SIM5 برای لنفوسیت‌های در حال تکثیر سمی نیست.

بخش بعدی نتایج اختصاص به فراکشن‌های جداشده از SIM5 دارد که بازهم درمورد هر فراکشن، اثر ضدتکثیری ازیک‌طرف و اثر تقویت‌کنندگی ایمنی از سوی دیگر بررسی شده‌اند. این فراکشن‌ها بر اساس وزن ملکولی تقریبی مواد تشکیل‌دهنده جدا شده‌اند. همان‌طور که در نمودارها دیده می‌شود، اکثر فراکشن‌ها دارای تأثیر توکسیک بر سلول سرطانی بودند؛ ولی محاسبهٔ IC50 نشان داد که بیشترین تأثیر در فراکشن‌های حاوی مواد با وزن ملکولی بین ۳۰-۵۰ کیلودالتون قرار دارد؛ یعنی فراکشن R30. البته باتوجه‌به روش تهیهٔ فراکشن‌ها این خلوص نسبی است و ممکن است تا حدی تداخل بین مواد فراکشن‌ها وجود داشته باشد. IC50 درمورد فراکشن R100 حدود ۱۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و درمورد فراکشن R30 حدود ۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر است که بسیار کمتر از عصاره (حدود ۴۱۵ میکروگرم) است.

ازآنجاکه در وزن‌های ملکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون، معمولاً بخش مهمی از مواد تشکیل‌دهنده می‌توانند پروتئینی باشند، در ادامه مقدار پروتئین موجود در هریک از فراکشن‌ها اندازه‌گیری شد و این بار، IC50 بر اساس مقدار پروتئین محاسبه گردید. بر اساس مقدار پروتئین، IC50 درمورد SIM5 حدود ۳۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد، ولی درمورد فراکشن R30 حدود ۱.۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر است (جداول ۵ و ۶).

بررسی تأثیر فراکشن‌ها بر فعالیت لنفوسیت‌های سالم، عمدتاً در فراکشن R10 دیده می‌شود؛ یعنی مادهٔ مؤثره بر فعالیت لنفوسیت‌ها در وزن ملکولی بین ۱۰-۳۰ کیلودالتون قرار دارد. لازم به ذکر است که دو پدیدهٔ مشاهده‌شده در این مطالعه، یعنی اثر ضدتکثیری بر سلول‌های سرطانی و اثر تقویتی بر تکثیر لنفوسیت‌ها می‌تواند توسط دو یا چند ملکول مجزا اعمال شود و این فرض که حتماً یک ملکول هر دو اثر را دارد، نیاز به آزمایشات و مشاهدات تکمیلی دارد. مطالعات بعدی، به‌خصوص درمورد فراکشنی که حاوی وزن ملکولی حدود ۱۰ کیلودالتون است می‌تواند این مطلب را بهتر روشن نماید.

درمجموع می‌توان گفت بر اساس نتایج فعلی به‌دست‌آمده در این مطالعه SIM5 می‌تواند ویژگی‌های مطلوبی ازنظر مقابله با سرطان داشته باشد که اهم موارد آن به‌شرح زیر است:

به‌دست‌آمده از گیاهی است که می‌تواند مصرف خوراکی داشته باشد.

مستقیماً اثر توکسیک قوی بر سلول‌های سرطانی دارد.

دارای قدرت افتراق بین سلول سالم در حال تکثیر و سلول سرطانی است.

اثر مهاری بر لنفوسیت‌های سالم و فعال نداشته،

Archive of SID

www.SID.ir

بلکه باعث افزایش فعالیت لنفوسیت‌ها هم می‌شود.

نهایتاً استفاده از این ماده و اجزای آن در مدل حیوانی سرطان و نیز بر روی سلول‌های سرطانی جداشده از بیماران، بررسی مکانیسم‌های ملکولی، بررسی میزان تأثیر آن در داخل بدن و موارد متعدد دیگر می‌تواند ازجمله مراحل بعدی تحقیق باشد. آنالیزهای شیمیایی و بیوشیمیایی بیشتر نیز می‌توانند کمک بسیار ارزشمندی برای یافتن ترکیبات مؤثر باشند.

تشکر

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد می‌باشد.

منابع

1. Hejmadi M. Introduction to cancer biology. Momna Hejmadi & Ventus. Publishing ApS. 2010.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144(5): 646-74.
3. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2015; 93: 52-79.
4. Karamitros D, Kotantaki P, Lygerou Z, Kioussis D, Taraviras S.T cell proliferation and homeostasis: an emerging role for the cell cycle inhibitor geminin. Critical Reviews in Immunology. 2011; 31(3): 209-31.
5. Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel Wde M, Andrade LE, Silva NP. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. Revista Brasileira de Reumatologia. 2010; 50(5): 552-80.
6. Kaiser HE, Nasir A and Nasir NA. Selected aspects of cancer progression: metastasis, apoptosis and immune response. (Cancer Growth and Progression, Vol.11). Springer Science, Business Media B.V. 2008.
7. Ramawat KG,Merillon JM. Bioactive Molecules and Medicinal Plants Kishan Gopal. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2008.
8. Rahimi R, Shams-Ardekani MR, Abdollahi M.A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. World Journal of Gastroenterology. 2010; 16(36): 4504-14.
9. Chang C, Gershwin ME. Integrative medicine in allergy and immunology. Clinical Reviews in Allergy and Immunology. 2013; 44(3): 208-28.
10. Sze DM, Chan GC. Supplements for immune enhancement in hematologic malignancies. Hematology / American Society of Hematology. Education Program. 2009: 313-9.
11. Solowey E, Lichtenstein M, Sallon S, Paavilainen H, Solowey E, Lorberboum-Galski H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. Scientific World Journal. 2014; 2014: 721402.
12. Yaraee R, Ghazanfari T, Shams J, Esmaeili M, Jamali D. The effects of SIM5 on human lymphoma cell lines and blood mononuclear cells. Daneshvar. 2008; 15(73): 73–78.
13. Barbour EK, Dankar SK, Shaib HA, Kumosani T, Azhar E, Masaudi S, Iyer A, Harakeh S. Antimicrobial profile of essential oils extracted from wild versus cultivated Origanum ehrenberjii against enteric bacteria. Journal of infection in developing countries. 2014; 8(10): 1344-9.
14. Bharti V, Vasudeva N, Kumar S. Anti-oxidant studies and anti-microbial effect of Origanum vulgare Linn in combination with standard antibiotics. Ayu. 2014; 35(1): 71-8.
15. Vujicic M, Nikolic I, Kontogianni VG, Saksida T, Charisiadis P, Orescanin-Dusic Z, Blagojevic D, Stosic-Grujicic S, Tzakos AG, Stojanovic I. Methanolic extract of Origanum vulgare ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity. British Journal of Nutrition. 2015; 113(5): 770-82.
16. Erenler R, Sen O, Aksit H, Demirtas I, Yaglioglu AS, Elmastas M, Telci İ. Isolation and identification of chemical constituents from Origanum majorana and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2016; 96(3): 822-36.
17. Mombeini T, Mombeini M, Aghayi M. Evaluation of Pharmacological Effects of Origanum genus (Origanum spp.). Journal of Medicinal Plants. 2009; 4(29): 18-35.
18. Ayesh BM, Abed AA, Faris DM. In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by Origanum syriacum L. and Thymus vulgaris L. extracts. BMC Research Notes. 2014; 7: 612.
19. Begnini KR, Nedel F, Lund RG, Carvalho PH, Rodrigues MR, Beira FT, Del-Pino FA. Composition and antiproliferative effect of essential oil of Origanum vulgare against tumor cell lines. Journal of Medicinal Food. 2014; 17(10): 1129-33.
20. Chinou I, Liolios C, Moreau D, Roussakis C. Cytotoxic activity of Origanum dictamnus. Fitoterapia. 2007; 78(5): 342-4.
21. Al Dhaheri Y, Attoub S, Arafat K, Abuqamar S, Viallet J, Saleh A, Al Agha H, Eid A, Iratni R. Anti-metastatic and anti-tumor growth effects of Origanum majorana on highly metastatic human breast cancer cells: inhibition of NFκB signaling and reduction of nitric oxide production. PLoS One. 2013; 8(7): e68808.
22. Nejad Shahrokhabadi K, Tavakkol Afshari J, Rakhshandeh H, Barouk A. Study Of cytotoxicity effect of total saffron extract on hepatocarcinoma cell line (HepG2). Medical Sciences. 2009; 19(3):154-159.
23. Tabasi N, Khajavi-Rad A, Mahmoudi M, Bahar-Ara J, Rastin M, HosainPour-Mashhadi M, et al. The effects of Nigella sativa ethanolic extract on proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma ACHN cell line. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 2010; 12(3): 7-14.
24. Momtazi-Borojeni AA, Behbahani M, Sadeghi-Aliabadi H. Antiproliferative activity and apoptosis induction of crude extract and fractions of avicennia marina. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2013; 16(11): 1203-8.
25. Mehrabian S, Majd A, Dana R. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of vegetative and generative parts of Plantago major L. in Langarood (Gilan) and Hesarak (Karaj) areas. Quarterly Journal of Biological Sciences. 2009; 1(2): 23-31.

Archive of SID

www.SID.ir