

مقاله اصلی

بررسی اثر عصاره گیاه هفت بند یا Polygonum Avicular بر میزان پروليفراسيون رده سلولي HeLa

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۱۵

خلاصه

مقدمه

سرطان سرویکس رحم شایع ترین سرطان در بین زنان کشورهای در حال توسعه می باشد. یکی از روش های درمانی که امروزه مورد استفاده قرار می گیرد، کاربرد داروهای گیاهی به عنوان مکمل می باشد و در راستای آن هدف از این تحقیق ارزیابی خاصیت آنتی تومورال عصاره گیاه پلی گونوم آویکولار بر روی رده سلولی HeLa بوده است.

روش کار

این تحقیق توصیفی در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است. سلول های HeLa در محیط RPMI -1640 (Rosewell park memorial institute) و با ۱۰٪ FBS (Fetal bovine serum) و در انکوباتور با شرایط ۵٪ Co2 و ۳۷°C با مقادیر مختلف (۰، ۰/۰۱، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۵) mg/ml عصاره پلی گونوم آویکولار کشت داده شدند. برای ارزیابی زنده بودن سلول ها از روش تریپان بلو و برای ارزیابی پروليفراسيون از MTT assay (3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl) استفاده شد. نتایج حاصل با نرم افزار SPSS و آزمون آماری تی تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

نتایج نشان داد که با روش MTT assay در دوزهای بالاتر از ۰/۱۵ mg/ml میزان پروليفراسيون سلول ها کاهش پیدا کرد.

نتیجه گیری

ثابت شده است که عصاره پلی گونوم آویکولار دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی فوق العاده ای است و به عنوان پاک کننده رادیکال های آزاد عمل می کند. با توجه به تولید بالای رادیکال های آزاد در بیماری هایی مانند سرطان استفاده از گیاهان دارویی با مقادیر بالای آنتی اکسیدان ها می تواند به عنوان مکمل درمانی برای سرطان و دیگر بیماری ها استفاده گردد.

کلمات کلیدی: HeLa cell line، پلی گونوم آویکولار، پروليفراسيون، سرطان گردن رحم

۱ حسین بنزاده
۲ عباس دل آذر
۳ مهریار حبیبی رودکنار
۴ محمد رحمتی یامچی
۵ بهناز صادق زاده اسکوتی
۶ احمد مهدی پور
۷ جعفر سلیمانی راد
۸ آمنه محمدی روشنده*

۱- کارشناس ارشد گروه ویروس شناسی،

دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- استاد گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم

پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- دانشیار بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات

سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

۴- استاد یار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی

تبریز، تبریز، ایران

۵-۶- کارشناس ارشد گروه علوم تشریحی،

دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۷- استاد گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم

پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۸- استاد یار گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم

پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* تبریز- دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه علوم

تشریحی، تبریز، ایران

تلفن: +۹۸-۴۱۱-۳۳۴۲۰۸۶

email: dinachal@yahoo.com

مقدمه

سرطان سرویکس دومین علت مرگ ناشی از سرطانها در زنان می باشد. در سال ۲۰۰۶، حدود ۵۰۰ هزار مورد جدید سرطان سرویکس گزارش شده و پیش بینی می شود در حدود ۲۸۰۰۰۰ مرگ ناشی از آن واقع شود که اکثر این بیماران در کشورهای در حال توسعه زندگی می کنند. سرطان گردن رحم رشد غیرقابل کنترل سلول های گردن (بخش واژینال) رحم می باشد. این سلولها از نظر عملکرد از بافتهای مجاور متفاوت بوده و خاصیت تهاجمی داشته و با بافتهای مجاور برای رسیدن به ذخایر خونی رقابت کرده و آن ها را از بین می برند (۱).

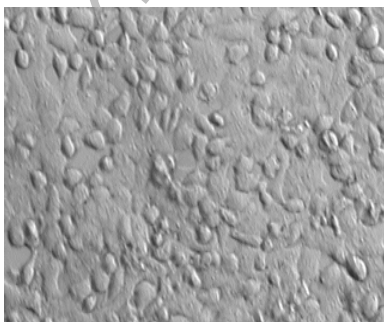
داروهای گیاهی در تمام مناطق در حال توسعه دنیا به طور گسترده استفاده می شوند. برخلاف استفاده زیاد، اطلاعات کمی در مورد سلامت و کارایی درمان های گیاهی وجود دارد. نشان داده شده است که برخی از گیاهان دارویی فعالیت ضد سرطانی دارند. کمبود شواهد علمی در ارتباط با مسیرهای فعالیت گیاهان دارویی استفاده بالینی آن ها را کاهش می دهد (۲، ۳).

پلی گونوم آویکولار^۱ از خانواده Polygonaceae – Dock family بوده و نام محلی آن گیاه هفت بند است. این گیاه در استرالیا، اروپا، جنوب آفریقا، مدیترانه، شمال آفریقا، خاور میانه و هند گسترش پیدا کرده است. این گیاه خاصیت قابض داشته و در درمان اسهال، بند آوردن خونریزی و بهبود زخم از آن استفاده می شود. این گیاه مدر است و در مواردی که احتباس ادرار رخ دهد استفاده می شود. همچنین برای دفع سنگ کلیه هم از آن استفاده می شود (۴). ثابت شده است که این گیاه دارای مقادیر زیادی آنتی اکسیدان است. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۶ صورت گرفته نشان داده شده است که پلی گونوم آویکولار دارای مقادیر زیادی فنولیک و فلاونوئید است (۵). در نظر داشته باشیم که در برخی از بیماری ها مانند پارکینسون، بیماری های قلبی و عروقی و سرطان میزان بسیار زیادی رادیکال های آزاد تولید می شوند و به کار گیری عصاره این گیاه با وجود مقادیر بسیار زیاد آنتی اکسیدان ها می تواند نتایج خوبی برای درمان این بیماری ها به همراه داشته باشد (۵-۹). با وجود مقادیر زیاد آنتی اکسیدان ها در این گیاه و با این پیش زمینه که در سرطان با مقادیر زیادی از رادیکال های آزاد مواجه هستیم، می توان

انتظاراثرات مثبت آن را در کنترل سرطان داشت. در سال ۱۹۵۱ رده سلولی HeLa مشتق از سلولهای سرطانی دهانه رحم خانم Henrietta Lacks در دانشگاه جان هاپکینز استخراج گردید (۱۰). از آن زمان به بعد از این رده سلولی به عنوان مدل مناسب برای مطالعه سرطان استفاده می شود. در مقاله حاضر اثرات عصاره پلی گونوم آویکولار بر میزان پرولیفراسیون سلول های رده HeLa بررسی شده است.

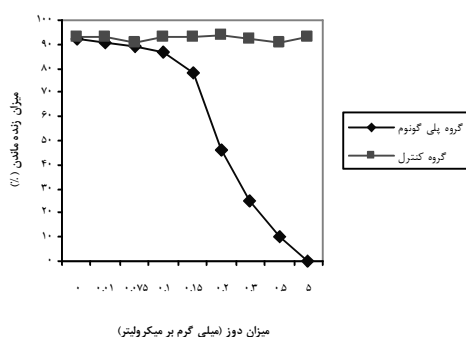
روش کار

این تحقیق توصیفی در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است. پس از جمع آوری گیاه از کوه های تبریز و تایید آن توسط استاد دانشکده داروسازی آقای دکتر دل آذر، درمحل مناسبی در فضای آزمایشگاه و به دور از نور خورشید خشک گردیده و آنگاه اندام های هوایی توسط آسیاب مکانیکی به پودر ریزی تبدیل گردیدند. ۱۰۰ گرم از پودر حاصله درون کاغذ کارتوش منتقل گردیده و به کاغذ کارتوش همراه محتویات در دستگاه سوکسله قرار گرفت. عمل استخراج توسط حلال متانول به مدت ۵ ساعت صورت پذیرفته و پس از عصاره گیری هریک از فراکسیونها توسط روتاری اوپوراتور در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و فشار کم تبخیر و کاملاً خشک گردیدند. عصاره خشک حاصله تا زمان به کارگیری در یخچال در دمای زیر صفر درجه نگهداری می شدند. رده سلولی آدنوکارسینوما سرویکس از انستیتو پاستور ایران (با کد C115) خریداری شد. این رده سلولی را در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ با ۱۰٪ FBS کشت داده و در شرایط ۵٪ CO₂ در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون انجام گرفت. سلول ها در مجاورت مقادیر مختلف mg/ml (۰، ۰/۱، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵) در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند (شکل ۱).

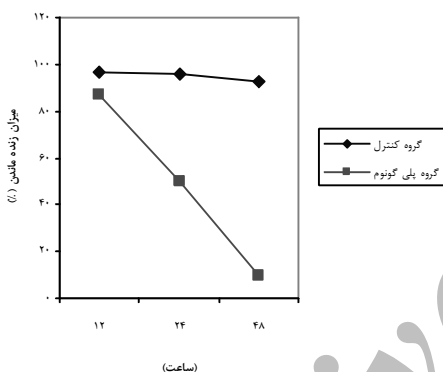


شکل ۱- سلول های رده HeLa بعد از کشت در فلاسک

¹ Polygonum aviculart



نمودار ۱- درصد زنده ماندن سلول ها در غلظت های مختلف عصاره پلی گونوم آویکولار



نمودار ۲- درصد زنده ماندن سلول ها متعاقب تیمار سلول ها با عصاره پلی گونوم آویکولار در زمان های مختلف

جدول ۱- درصد زنده ماندن سلول های کشت داده شده با مقادیر مختلف عصاره در دو گروه کنترل و گروه آزمون

گروه ها / دوز (میلی گرم / میکرولیتر)	درصد زنده ماندن در گروه پلی گونوم (آویکولار) (%)	درصد زنده ماندن در گروه کنترل (%)
0	92	93
0.1	91	93
0.25	89	91
0.5	87	93
1	78	93
2	46	94
3	25	92
5	10	91
5	0	93

درصد سلولهای زنده با استفاده از آزمایش تریپان بلو محاسبه گردید. ابتدا رنگ ۰/۴٪ تریپان بلو تهیه گردیده و به سلول ها اضافه گردید. سلول هایی که به رنگ آبی بودند مرده محسوب شده و در غیر این صورت سلول ها را زنده در نظر گرفته می شدند. تعیین میزان سایتوتوکسیته پلی گونوم آویکولار با استفاده از MTT Assay رده سلولی سرطان سرویکس Hela-S در محیط حاوی RPMI، ۱۰٪ FBS در شرایط دمایی ۳۷ درجه و ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. سپس با رقت های تهیه شده از عصاره متانولی پلی گونوم آویکولار تیمار شده و به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط دمایی ۳۷ درجه و ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. پس از گذراندن دوره انکوباسیون میزان سایتوتوکسیته آن با افزودن MTT بررسی گردید. برای این منظور ۵۰μl از محلول MTT (2mg/ml) به تمامی خانه ها اضافه می گردد. پلیت را در فویل آلومینیومی پیچیده و در ۳۷ درجه به مدت ۴ ساعت انکوبه می شود. پس از این مرحله محیط حاوی MTT به دقت خارج می شود و ۲۰۰μl از DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه شده و در ادامه ۲۵μl از بافر گلیسین به هریک از خانه ها افزوده شد. سپس جذب با استفاده از میکروپلیت ریدر Stat-fax ۲۱۰۰ در طول موج ۵۷۰nm اندازه گیری گردید. برای آنالیز نتایج حاصل از نرم افزار SPSS و آزمون تی تست استفاده گردید و معیار معنی دار بودن با $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از رنگ آمیزی تریپان بلو نشان داد که با افزایش میزان غلظت عصاره پلی گونوم آویکولار سلول های بیشتری دچار مرگ سلولی می شدند که در غلظت های بالاتر تقریباً تمام سلول ها دچار مرگ شدند. بررسی پروليفراسیون سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که میزان پروليفراسیون سلول ها با افزایش غلظت عصاره کاهش پیدا کرد. همچنین میزان پروليفراسیون در زمان های مختلف نشان داد که با گذشت زمان و مواجهه بیشتر با عصاره میزان پروليفراسیون کاهش پیدا کرده و در زمان ۲۴ ساعت تقریباً میزان پروليفراسیون به صفر رسید (نمودار ۱، ۲). در جدول ۱ و ۲ درصد زنده ماندن سلول های کشت داده شده با مقادیر و زمان های مختلف نشان داده شده است.

جدول ۲- درصد زنده ماندن سلول های کشت داده شده در

زمان های مختلف

گروه ها / زمان (ساعت)	درصد زنده ماندن در گروه پلی گونوم آویکولار(%)	درصد زنده ماندن در گروه کنترل (%)
۱۲	۸۷	۹۷
۲۴	۵۰	۹۶
۴۸	۱۰	۹۳

آویکولار دارای اثرات تخریبی و لیزکنندگی بر روی سلولهای سرطانی می باشد. این نتایج هر چند با پیش بینی های این مطالعه در غلظت های پایین مطابقت نداشت اما در غلظت های بالا حاکی از اثرات این گیاه بر سلولهای سرطانی بود.

نتیجه گیری

بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق نشان از اثرات تخریبی عصاره گیاه پلی گونوم آویکولار بر سلولهای سرطان سرویکس دارد که چنین مطالعه ای با استفاده از عصاره این گیاه تا به حال صورت نگرفته بود.

این نتایج موید این مطلب است که این گیاه می تواند به عنوان یک گیاه داروئی گزینه قابل تامل به منظور درمان موثر و حتی در جلوگیری از پیشرفت رشد سلولهای سرطانی در محیط *In vivo* مورد توجه قرار گیرد. بنابراین این طرح پیش در آمدی بر مطالعه اثرات ضدسرطانی این گیاه بومی بوده و نیاز به مطالعات بیشتری بر رده های سلولی مختلف مرتبط با سرطان سرویکس و سایر سرطانها در محیط *In vitro* دارد تا با اطمینان بیشتر در مورد کاربرد آن به طور *In vivo* بحث کرد. پیشنهاد می شود غلظتهای مورد مطالعه این پژوهش و سایر غلظت ها بر تومورهای مشخصی بر حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار بگیرند تا در صورت امکان به توان آن را به صورت یک روش درمانی روتین و موثر استفاده کرد. نتایج حاصل از طرح حاضر نشان داد که عصاره پلی گونوم آویکولار نقش آنتی تومورال داشته و استفاده از آن موجب کاهش تکثیر سلول های سرطان رحم شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه علوم تشریحی تبریز برای همکاری در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می شود. هزینه این پروژه تحقیقاتی توسط مرکز تحقیقات کاربرد دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تامین شده است.

بحث

همان طور که از نتایج بر می آید عصاره گیاه پلی گونوم آویکولار مانع از تکثیر سلول های رده HeLa گردیده که نشان از خاصیت آنتی پرولیفیریتیو این ماده دارد. ثابت شده است که این گیاه دارای مقادیر زیادی آنتی اکسیدان است. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۶ صورت گرفته نشان داده شده است که پلی گونوم آویکولار دارای مقادیر زیادی فنولیک و فلاوونوئید است. در نظر داشته باشیم که در برخی از بیماری ها مانند پارکینسون، بیماری های قلبی و عروقی و سرطان میزان بسیار زیادی رادیکال های آزاد تولید می شوند و به کار گیری عصاره این ماده به علت وجود مقادیر بسیار زیاد آنتی اکسیدان ها از طرف محققین برای درمان این بیماری پیشنهاد می شود (۵).

پرولیفراسیون سلولهای سرطانی HeLa در محیط کشت RPMI 1640 با غلظت های ۰/۱، ۰/۵، ۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانول پلی گونوم آویکولار در زمان های مختلف ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت آزمایش شدند ولی هیچ یک از غلظت های گفته شده بر میزان پلی لیفراسیون سلولهای سرطانی تاثیری نداشتند و غلظت های بالای عصاره ی این گیاه در زمانهای مختلف (۱۵۰، ۲۰۰، ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) باعث کاهش پرولیفراسیون شدند. بنابراین برای اطمینان از صحت نتایج حاصل و رد خطاهای آزمایشگاهی غلظت های بالاتری از عصاره همراه با غلظت های مورد مطالعه در کنار کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره گیاه پلی گونوم

References:

- 1- Castellsague X, Diaz M, Sanjose S. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:303-315.
- 2- Cassileth BR, Deng G. Alternative and complementary medicine. *Cancer. Oncologist* 1995; 9:80-89
- 3- Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, Delbanco TL. Unconventional medicine in the United States: Prevalence, costs, and patterns of use. *N Engl J Med* 1993; 328:246-252.
- 4- Lazarides M, Cowley K, Hohnen, P. *Handbook of Australian Weeds*. 7th ed. CSIRO publishing;1997.p. 264.
- 5- HSU CY. Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. *Biol Res* 2006; 39: 281-288.
- 6- Smith MA, Perry G, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 1996; 382: 120-121.
- 7- Kähkönen MP, Hopia A, Vuorela HJ, Rauha J, Pihlaja K, Kujala T, *et al.* Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 1999; 47:3954-3962.
- 8- Cerutti PA. Oxy-radicals and Cancer. *Lancet* 1994; 344:862-863.
- 9- Kruawan K, Kangsadalampai K. Antioxidant activity, phenolic compound contents and antimutagenic activity of some water extract of herbs. *Thai J Pharm Sci?* 2006; 30:28-35.
- 10- Gey G, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 1952; 12:264-265.

Archive of SID