

بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته آویشن باغی بر رده‌ی سلولی سرطان پستان

دکتر احمد همتا^۱، صفیه قزاقی^۲

^۱ استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه علوم اراک، اراک، ایران

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه علوم اراک، اراک، ایران

نشانی نویسنده مسؤل: 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 در بین زنان ایرانی می‌باشد. خوشبختانه این سرطان از زمره‌ی سرطان‌های قابل پیشگیری و قابل تشخیص زودرس است. عصاره‌ی هیدروالکلی برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار گیاه آویشن باغی، دارای ترکیبات گوناگونی است که مهم‌ترین آنها تیمول و کارواکرول می‌باشند. اثرات ضد سرطانی عصاره‌ی مذکور را به‌طور عمده به این ترکیبات نسبت می‌دهند. هدف از این تحقیق، مقایسه‌ی اثر بخشی عصاره‌ی هیدروالکلی و تاکسول بر روی سلول‌های رده 4T1 و میزان تأثیر آن‌ها بر آلفا مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، سلول‌های سرطانی رده 4T1 از انستیتو پاستور تهران خریداری و عصاره‌ی هیدروالکلی به‌روش سوکسله تهیه‌شده است. میزان سایتوتوکسیسیته پنج دوز مختلف از عصاره و پنج دوز مختلف از تاکسول در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌دست آورده‌شده و بدین منظور، توانایی زیستی سلول‌ها با روش MTT و تریپان بلو بررسی گردیده است. هم‌چنین بررسی تغییرات مورفولوژیک با روش‌های رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم آبوداید انجام‌شده است.

یافته‌ها: سلول‌های تحت تیمار با عصاره‌ی هیدروالکلی و تاکسول در زمان‌های مختلف تفاوت بارز و وابسته به دوزی را نشان داده‌اند به‌طوری 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 سایتوتوکسیسیته تاکسول را افزایش دهد بنابراین هم می‌تواند در درمان سرطان سینه مؤثر باشد و احتمالاً با آلفا آپوتوزیس باعث مرگ سلول‌ها گردد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، تاکسول، گیاه آویشن باغی، سایتوتوکسیسیته

مقدمه

سرطان در صورت عدم درمان، به‌طور حتم به مرگ منجر خواهد شد (۱). بدن انسان، مجموعه‌ای از سلول‌هایی است که هرکدام وظیفه‌ی خاصی به‌عهده دارند. اگر

در کشورهای توسعه یافته بیش از ۱۰٪ کل هزینه‌ی مراقبت‌های پزشکی برای سرطان صرف می‌شود.

سلولی به صورت غیرقابل کنترل رشد و تکثیر یابد، مشکلات بسیاری برای خود و دیگر 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). به عبارت ساده‌تر، سرطان نوعی بیماری است که در آن، سلول‌های غیرطبیعی به شکل مهار ناپذیری تقسیم می‌شوند و قادرند به سایر بافت‌ها حمله کنند (۳).

کارشناسان می‌گویند از هر هشت زن، یک نفر شانس ابتلاء به سرطان پستان را داراست (۴). ترس ابتلاء به سرطان پستان، منجر شده که زنان با بروز علائم در پستان مراجعه‌ی خود را به پزشک تعویق بیندازند و مانع تشخیص و درمان به موقع بیماری توسط پزشک شوند (۴). 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 با توجه به پیچیدگی مکانیسم و وجود عوامل متعدد در ایجاد سرطان، تاکنون درمان قطعی برای این بیماری یافته نشده است.

هم اکنون با وجود پیشرفت کاربرد داروهای سنتزی، هنوز گیاهان دارویی و اشکال دارویی حاصل از آنها در مقیاس وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. به طوری که در برخی کشورها، از اجزای لاینفک سیستم دارودرمانی محسوب می‌شوند و بازار تجارت آنها نیز در مقایسه با سایر داروهای شیمیایی رونق افزونتری دارد (۶). 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 و اهلی کردن، اصلاح گونه‌های مهم، بررسی روش‌های نوین در افزایش مواد مؤثر و مطالعه اثرات دارویی آنها صورت گرفته است.

آویشن، نیز یکی از گیاهانی است که دارای

خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد. چیزی که به تازگی و در یکی دوده‌ی اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته، خواص ضدسرطانی و آنتی‌کارسینوزیک 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، ضد عفونی‌کننده، ضدسرفه، ضداسپاسم و خلط‌آور هستند (۷ و ۸). 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 به طور 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 هیدروالکلی گیاه آویشن باغی و گروه شاهد آنها بر سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 انجام گرفته و با داروی ضدسرطانی تاکسول مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ابتداء رده‌ی سلولی 4T1 از بانک سلولی انستیتوپاستور تهران خریداری و سلول‌ها براساس پروتکل دفریز گردیده‌اند. سپس در محیط کشت RPMI (تهیه شده از شرکت بازرگانی صدف نیلگون پارس) دارای ۱۰ درصد FBS (تهیه شده از شرکت نوآوری زیستی گویا) کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت، پاساژ سلولی انجام گرفته و سلول‌ها به دو فلاسک حاوی ۱۵ ml محیط کشت RPMI سرم دار توزیع شده است.

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

از بالن تحتانی، به طور مداوم، حلال خالص بر روی ماده‌ی گیاهی قرار گرفته و موجب خروج کامل مواد مؤثر از درون سلول‌های گیاهی می‌گردد.

در این تحقیق، از دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن باغی و ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاکسول و یک گروه شاهد فاقد تاکسول و عصاره‌ی استفاده‌شده‌است. در ساخت غلظت‌های مورد نیاز، دوز اصلی غلیظ‌ترین دوز است که غلظت‌های بعدی از آن تهیه گردیده‌است. پس از ساخته شدن دوز اصلی، با فیلتر سرسورنگی استریل و سپس مقدار مورد نیاز از آن برداشته شده تا با به‌حجم‌رساندن توسط محیط کشت غلظت‌های مورد نظر تهیه گردند. برای تهیه‌ی دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی استوک ۱۰ mgr/ml است که برای ساخت دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک با ۹۰۰ میکرولیتر محیط سرم‌دار مخلوط شده تا، دوز مورد نظر ساخته شود. دوز ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شامل ۸۰ میکرولیتر استوک ۹۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محیط سرم‌دار، دوز ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شامل ۴۰ میکرولیتر استوک ۹۶۰ میکرولیتر محیط سرم‌دار، دوز ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شامل ۲۰ میکرولیتر استوک ۹۸۰ میکرولیتر محیط سرم‌دار و دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شامل ۱۰ میکرولیتر استوک ۹۹۰ میکرو لیتر محیط سرم‌دار است.

به منظور بررسی اثرکاهنده و یا افزایشده‌ی عصاره‌ها بر سایتوتوکسیسیتی القاء شده توسط تاکسول، تاکسول به همراه هریک از عصاره‌ها به صورت همزمان و با دوزهای متناظر (برای ترکیب عصاره‌ی هیدروالکلی ۱۰۰+۰/۰۱، ۲۰۰+۰/۱، ۴۰۰+۰/۱، ۸۰۰+۱، ۱۰۰۰+۱) و تاکسول و عصاره‌ی هیدروالکلی هرکدام به تنهایی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته روی سلول‌ها اثر داده شده و میانگین توانایی زیستی سلول‌ها به روش‌های جذب - تریپان بلو و رنگ سنجی MTT محاسبه و برای بررسی

تغییرات مورفولوژیکی، از روش‌های رنگ‌آمیزی هوشست و پرویدیدوم آیوداید استفاده شده‌است. 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 ۰۰۵ معنادار تلقی گردیده است.

روش MTT

پس از پاساژ دادن سلول‌ها و شمارش آنها با هموسیتمتر، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت با محیط کشت سرم‌دار در انکوباتور قرار گرفته تا سلول‌ها به کف چاهک-ها بچسبند. سپس ویال‌ها را با بافر شست و شوداده و با ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۲۰ میکرولیتر از دوز مورد نظر تیمار کرده شده و هر تیمار، سه بار تکرار گردیده‌است. سپس پلیت‌ها به مدت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور CO₂ دار و دمای ۳۷ درجه قرار گرفته شده‌است. پس از طی زمان مورد نظر، محیط قبلی برداشته و با بافر شست‌وشو داده شده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه‌ی بدون سرم و ۱۰ میکرولیتر محلول MTT به هر ویال اضافه گردیده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفته شده‌است. پس از گذشت ۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج و محیط حاوی MTT برداشته شده و به هر ویال ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول ریخته و سپس به مدت ۲ ساعت در تاریکی قرار داده شده‌است. بعد از گذشتن 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 DLGNOSTIC خوانده و از فرمول ذیل، برای محاسبه‌ی میزان زنده بودن سلول‌ها استفاده گردیده‌است (۱۰).

$$100 \times (\text{OD کنترل} / \text{نمونه OD}) = \text{توانایی زیستی سلولها}$$

روش تریپان بلو

تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول در پلیت ۶ خانه ریخته و سپس

هسته‌ی سلول‌ها، از میکروسکوپ فلورسانس استفاده شده است. برای انجام این تست، پس از ریختن سلول‌ها در پلیت ۶ خانه، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفته و پس از سپری شدن زمان لازم، محیط رویی برداشته و ویال‌ها با دوز موردنظر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شده و پس از گذشت زمان موردنظر، محیط رویی کشیده و ویال‌ها با بافر شست‌شوداده شده و به هر ویال ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محلول هوخست اضافه‌گردیده و به مدت ۶ تا ۸ دقیقه، انکوبه شده است. سپس سلول‌ها، با بافر شست‌شو داده شده و هسته‌ی سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس مطالعه‌گردیده است. در رنگ‌آمیزی هوخست، سلول‌ها به صورت آبی‌رنگ می‌شوند. در مرحله‌ی بعد، هرچاهک با بافر شست‌شو داده شده و رنگ پروپیدیوم آیویداید اضافه‌گردیده است. در این حالت، رنگ پروپیدیوم آیویداید 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

شماره گذاری شده و به هر پلیت ۲-۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه و به مدت ۲۴ ساعت و به منظور اتصال سلول‌ها به بستر خود در انکوباتور قرار گرفته شده است. پس از ۲۴ ساعت، محیط رویی سلول‌ها خارج و محیط فاقد سرم حاوی عصاره با دوزهای مختلف ۵ خانه پلیت اضافه و خانه‌ی ششم کنترل در نظر گرفته شده، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ قرار گرفته شده است. بعد از این مدت تمام، خانه‌های پلیت تریپسین زنی شده است. سپس با اضافه کردن محیط کشت کامل، تریپسین غیر فعال و به نسبت ۱:۱ تریپان بلو ۰/۴ درصد به هر خانه اضافه شده است. پلیت به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه، نکوبه‌گردیده است. شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار (در خانه‌های متعلق به شمارش گلبول‌های سفید) انجام گرفته است. سلول‌های آبی رنگ به عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های بی‌رنگ به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شده است. سپس با استفاده از فرمول ذیل، درصد حیات سلول‌ها در هر غلظت محاسبه گردیده است (۱۱).

$$viability = 100 \times (\text{تعداد کل سلول‌ها} / \text{تعداد سلول‌های زنده})$$

تست‌های رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیویداید

در رنگ‌آمیزی هوخست برای بررسی مورفولوژی

جدول ۱: میانگین توان زیستی سلول‌های رده 4T1، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول باروش MTT.

زمان	غلظت					شاهد
	۰	۱	۰/۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱	
	μgr/ml	μgr/ml	μgr/ml	μgr/ml	μgr/ml	
۲۴H	۵۰/۶۴±۱/۳۴	۵۲/۱۶±۰/۹۹	۵۶/۳۲±۰/۹۵	۶۹/۳۶±۰/۸	۷۷/۲۴±۱/۰۲	۱۰۰
۴۸H	۳۱/۷۷±۰/۹۱	۳۹/۶۹±۱/۰۸	۵۴/۳۹±۱/۰۵	۶۴/۵۵±۰/۹۲	۷۵/۲۵±۰/۹۶	۱۰۰
۷۲H	۲۷/۲۹±۰/۸۳	۳۲/۷۴±۱/۰۶	۴۹/۰۸±۱/۰۰	۵۸/۸۱±۱/۰۶	۷۲/۸۴±۱/۰۶	۱۰۰

مقادیر به دست آمده، به صورت Mean±SD می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شده است (ANOVA, Tukey testone way).

جدول ۲: میانگین توان زیستی سلول‌های رده 4T1، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی باروش MTT.

زمان	غلظت					شاهد
	۱۰۰۰	۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	
	μgr/ml	μgr/ml	μgr/ml	μgr/ml	μgr/ml	
۲۴H	۴۹/۸۱±۱/۰۵		۷۰/۲۶±۱/۱۲	۷۸/۱۴±۱/۱	۸۸/۵۴±۱/۰۹	۱۰۰
۴۸H	۲۹/۷۱±۰/۹		۵۸/۲۹±۰/۸۵	۶۷/۸۸±۱/۰۰	۷۱/۴۹±۱/۲۴	۱۰۰
۷۲H	۲۳/۶۸±۰/۸۶	۳۰/۵±۰/۸۶	۵۰/۷۴±۱/۴۵	۶۲/۵۵±۱/۰۶	۶۶/۷۳±۰/۹۲	۱۰۰

مقادیر به دست آمده، به صورت Means ±SD می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شده است (ANOVA, Tukey test one way).

جدول ۳: میانگین توان زیستی سلول‌های رده 4T1، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمارهم زمان با دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی با تاکسول به روش MTT.

غلظت						زمان
۱۰۰۰۰/۱۰	۸۰۰۰/۱	۴۰۰۰/۱	۲۰۰۰/۰۱	۱۰۰۰/۰۰۱	شاهد	
$\mu\text{gr/ml}$	$\mu\text{gr/ml}$	$\mu\text{gr/ml}$	$\mu\text{gr/ml}$	$\mu\text{gr/ml}$		
۴۶/۵۷±۰/۸۶	۴۹/۱۹±۰/۹۸	۵۰/۸۴±۰/۴۳	۶۵/۱۳±۲/۰۱	۷۲/۷۹±۱/۵	۱۰۰	۲۴H
۲۵/۷۹±۱/۰۵	۲۸/۷۲±۱/۰۹	۴۵/۶۶±۰/۹۹	۵۱/۷۵±۰/۸۸	۶۰/۸۵±۰/۹۱	۱۰۰	۴۸H
۲۴/۶۵±۱/۰۶	۲۸/۴۵±۰/۸۷	۷۳/۳±۱/۱۳	۴۸/۳±۱/۱۴	۵۷/۲۹±۱/۱۱	۱۰۰	۷۲H

مقادیر به دست آمده، به صورت Means \pm SD می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شده است (ANOVA, Tukey test one way).

جدول ۴: میانگین توان زیستی سلول‌های رده 4T1، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمارهم زمان با دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی با تاکسول به روش تریپان بلو.

غلظت						زمان
۱۰۰۰۰/۱۰	۸۰۰۰/۱	۴۰۰۰/۱	۲۰۰۰/۰۱	۱۰۰۰/۰۰۱	شاهد	
$\mu\text{gr/ml}$	$\mu\text{gr/ml}$	$\mu\text{gr/ml}$	$\mu\text{gr/ml}$	$\mu\text{gr/ml}$		
۲۶/۳۵±۱/۰۸	۳۶/۰۳±۰/۹۸	۴۹/۰۹±۱/۰۲	۵۳/۲۷±۰/۹۴	۶۶/۲۶±۱/۱۱	۹۸/۱۶±۰/۹۵	۲۴H
۱۸/۲±۱/۰۱	۲۵/۲±۰/۹۴	۲۹/۷۱±۰/۹۲	۴۹/۰۹±۱/۰۵	۵۴/۱۴±۱/۰۱	۹۸/۰۹±۱/۰۱	۴۸H
۱۸/۱۳±۰/۹۴	۲۳±۱/۰۱	۲۸±۰/۹۹	۴۱/۵۹±۱/۱۱	۵۲/۵۴±۱/۰۰	۷۶/۳۲±۱/۰۴	۷۲H

مقادیر به دست آمده، به صورت Means \pm SD می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شده است (ANOVA, Tukey test one way).

تثبیت آنها در سلول و در نهایت، از بین رفتن توانایی سلول در استفاده از یک اسکلت سلولی انعطاف پذیر (که وجود آن در بسیاری از عملکردهای سلولی از قبیل تقسیم میتوز، حیاتی است) شده و بدین ترتیب، سلول پس از مدتی دچار وقفه در رشد شده و از بین می‌رود (۱۳).

در این 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 تأثیر ضد سرطانی آن به سلول‌ها افزایش می‌یابد.

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

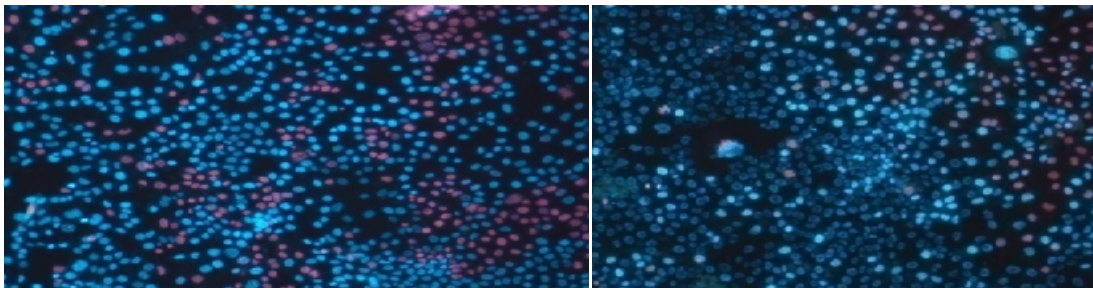
بر اساس نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و MTT، کاهش توانایی حیات سلول‌های سرطانی رده‌ی 4T1 در تیمار با عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی، دیده شده که با نتایج حاصل از پژوهش Sertel و همکاران

جدول ۴ نشان داده شده است. مقایسه‌ی میانگین توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، اختلاف معناداری میان تمام گروه‌های تیمار شده با دوزهای مختلف تاکسول، عصاره‌ی هیدروالکلی و عصاره‌ی هیدروالکلی / تاکسول در هر دو روش نشان می‌دهد. به گونه‌ای که با افزایش میزان دوز قابلیت حیات سلول‌ها کاهش معناداری پیدا می‌کند.

عکس شماره‌ی (۱) نشان می‌دهد که در رنگ-آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیداید 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 دیمرها، توبولین (واحد ساختمانی میکروتوبول‌ها) افزایش می‌دهد و با جلوگیری از دپلمیریزاسیون میکروتوبول‌ها، موجب



ب

الف

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

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، قادر است آندروژن را به استروژن تبدیل کند (۱۹). بنابراین، احتمال می‌رود ترکیبات عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی با مهار آروماتاز توسط مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز، میزان استروژن را کاهش داده که این خود، باعث کمتر شدن رشد تومور خواهد شد.

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

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

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-راستا است. فقط رده‌های سلولی مورد بررسی متفاوت است (۱۴).

در سال ۲۰۰۸، تحقیقات Rana نشان داده که عصاره‌ی آویشن، باعث بهبود پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه، کمک به جلوگیری از استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۵). در پژوهشی که در سال ۲۰۰۸، توسط Joekim و همکارانش انجام شده، ردپای آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و استرس اکسیداتیو در جریان دگرگونی‌های رشد و تمایز سلول، از جمله سرطان به تأیید رسیده و مشخص شده که در عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن باغی ترکیباتی وجود دارند که آنزیم‌های مذکور را مهار می‌کنند و موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند. از طرفی، تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که آنزیم‌های سیکلواکسیژناز، در مکانیسم‌های سرطان‌زایی، نقش بسیار مهمی دارند. به-عنوان مثال، مهار آپیتوزیس توسط تشدید فعالیت آنزیم‌های مذکور به اثبات رسیده است (۱۶، ۱۷).

در سال ۲۰۰۱، Liang و همکارانش دریافتند که فلاونوئیدهای موجود در آویشن، PPAR? (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) را فعال کرده و به موجب آن بیان COX-2 را مهار می‌نمایند (۱۸). بنابراین احتمال داده می‌شود که عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی با مهار بیان Cox-2

ضدسرطانی و سایتوتوکسیک عصاره‌ی هیدروالکلی را ناشی از ترکیباتی از قبیل تیمول، کارواکرول و غیره دانست.

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

تشکر و قدردانی

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

در نهایت، می‌توان چنین نتیجه‌گرفت که ترکیبات مؤثر موجود در عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن باغی، مسؤول القاء مرگ سلولی (احتمالاً از نوع آپتوزیس) در سلول‌های سرطانی رده 4T1 بوده و می‌بایست خواص

References

1. Thompson. GhofranI M, Habibi L .Genetics in Medicine. Farda. 2009.[Persin]
2. Croce CM. Oncogenes and cancer .The New England journal of medicinè. 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, Rodrigue 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, Dr?cea NO, Dragomirescu CC, Dr?gulescu 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. Bioassay Techniques. 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- f2? 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 cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Surg Res.* 2002; 108: 173-9.

Archive of SID

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

Ahmad Hamta

Assistant Professor of Molecular Genetics , Biology Department, Faculty of Science , University of Arak, Arak, Iran.

Safiyeh Ghazaghi

Master of science in Genetic, Department of Biology , Faculty of Science, University 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 *Thymus vulgaris* contain various ingredients 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 ingredients. 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 Propidium iodide 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