مقاله پژوهشی

اثر سمیت سلولی ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی روی رده سلول‌های سرطانی MCF-7

نویسندگان:

فاطمه صادقی سامانی [۱]، حسین سازگار*[۱]، عبدالله قاسمی پیربلوطی [۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.2, Summer 2016

چکیده:

مقدمه: سرطان پستان دومین سرطان شایع در زنان بعد از سرطان ریه است. با توجه به این‌که ترکیبات گیاهی مدت‌ها است برای درمان سرطان استفاده می‌شوند، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر سمیت سلولی ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی روی رده سلول‌های سرطانی MCF-7 بود.

روش کار: سلول‌های سرطانی MCF-7 و سلول‌های طبیعی فیبروبلاست در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک کشت شدند. این سلول‌ها در مجاورت دوزهای مختلف ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی (۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفتند و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، به روش تغییریافته آزمون رنگ سنجی MTT (Methyl Tetrazolum) سمیت سلولی عصاره تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی اثر ضد سرطانی وابسته به دوز و زمان روی سلول‌های سرطانی MCF-7 دارد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره و انکوباسیون ۷۲ ساعت بیش‌ترین درصد مرگ سلولی مشاهده شد (P<۰/۰۵). این عصاره سمیت سلولی قابل‌توجهی را روی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست نشان نداد.

بحث و نتیجه‌گیری: ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی اثر سمیت سلولی روی سلول‌های سرطانی MCF-7 داشته درحالی‌که این عصاره اثر سمیت سلولی روی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست ندارد. از این رو به نظر می‌رسد با تحقیقات بیش‌تر در آینده می توان از ترکیبات آن در درمان سرطان بهره جست.

واژگان کلیدی: کلوس، آویشن دنایی، MCF-7، آزمون MTT

Pars J Med Sci 2016;14 (2):57-65

مقدمه:

سرطان همچنان به‌عنوان یکی از علل عمده مرگ‌ومیر در سراسر جهان مطرح است و پیشرفت اندکی در کاهش عوارض مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری حاصل‌شده است. این گروه از بیماری‌ها با از دست دادن کنترل چرخه سلولی با آنژیوژنز و متاستاز همراه است [۱].

از بین سرطان‌های زنان، سرطان پستان با توجه به این‌که شایع‌ترین نوع سرطان و بعد از سرطان ریه دومین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان است مهم‌ترین عامل نگران‌کننده سلامتی محسوب می‌شود [۲].

این نوع سرطان یک بیماری پیچیده است که تعدادی عوامل خطرناک در پیدایش و گسترش آن دخیل هستند. این بدخیمی تا حد زیادی در برابر استراتژی‌های درمانی فعلی مقاوم باقی‌مانده و بسیاری از بیماران مبتلا به آن دچار متاستاز شده و در نهایت جان خود را از دست می‌دهند [۳].

ازآنجا که بسیاری از داروهای شیمیایی باعث اختلالات گوارشی و آسیب‌های کلیوی می‌شوند، دانشمندان به دنبال یافتن داروهایی هستند که عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی داشته باشند. در این راستا گیاهان دارویی مورد توجه

* نویسنده مسئول، نشانی: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

تلفن تماس: ۰۹۱۷۷۱۲۱۹۹۳ پست الکترونیکی:hoseinsazgar@yahoo.com

دریافت: ۹۵/۱/۳۰ اصلاح: ۹۵/۳/۳۰ پذیرش: ۹۵/۵/۱۷

بسیار قرارگرفته‌اند [۴]. بسیاری از گیاهان و ادویه‌ها حاوی عناصری برای جلوگیری از سرطان هستند که می‌توانند اثرات خود را در مراحل مختلف شروع و رشد سلول‌های سرطانی اعمال کنند [۵].

گیاه معطر و دارویی کرفس بختیاری (کلوس) با نام علمی Kelussia odaratissma Mozaff گیاهی علفی، چندساله از خانواده چتریان (Apiaceae) دارای ساقه منشعب، توخالی شیاردار به ارتفاع ۲۰ تا ۶۰ سانتی‌متر است که ارتفاع گل آن گاهی تا ۲۰۰ سانتی‌متر نیز می‌رسد. مهم‌ترین رویشگاه‌های این گیاه در جنوب غربی ایران و ارتفاعات کوه‌های زاگرس بختیاری است [۶]. تاکنون وجود ترکیباتی مثل فتالید، فلاونوئید و ترپنوئید در این گیاه گزارش‌شده است [۷]. این گیاه با دارا بودن ترکیباتی چون فلاونوئید که به‌طور عمده در بذر، ساقه و گل‌آذین گیاه انباشته شده‌اند دارای اثرات ضدالتهابی، ضدویروس، ضد دیابت، ضد سرطان و ضد مسمومیت است [۶] فتالیدها گروه دیگری از ترکیبات مؤثر این گیاه هستند که آن را به‌صورت مکمل غذایی و عامل پیشگیری‌کننده شیمیایی از سرطان و زخم معده و محافظ کبد مطرح می‌کنند [۸]. نتایج آزمایش‌های مختلف نشان داد که این مواد در مهار کردن تومور معده و کاهش ازدیاد آن به میزان ۶۷ تا ۸۳ درصد تأثیر مثبت داشته‌اند [۶]. همچنین طی مطالعاتی مشخص شد که بعضی از ترکیبات موجود در بذر و گل این گیاه عامل احتمالی مهار رشد سلول‌های سرطان کبد و ملانومای انسانی است [۹].

آویشن دنایی با نام علمی Thymus daenesis Celak از گیاهان خانواده نعنا (Lamiaceae) [۱۰]، گیاهی است علفی و چندساله، دارای ساقه‌های متعدد و پرپشت که ارتفاع آن به ۳۰-۲۵ سانتی‌متر می‌رسد. این گیاه در مناطقی از استان‌های چهارمحال و بختیاری، فارس، همدان، ایلام، مرکزی، کهکیلویه و بویراحمد و همچنین کردستان می‌روید [۱۱]. این گیاه حاوی ترکیبات تانن، فلاونوئید، گلیکوزید، کافئیک اسید و رزمارینگ اسید است [۱۲]. بر اساس نتایج تحقیق برازنده و باقرزاده ترکیبات تیمول، پاراسیمن، گاماترپینن، کارواکرول و بتا- کاریوفیلین از عمده‌ترین ترکیب‌های این گیاه هستند [۱۳]. آویشن دنایی دارای اثرات نیرو دهنده، هضم‌کننده، ضد اسپاسم، بادشکن، ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد تشنج، ضد کرم و ضد رماتیسم، خلط‌آور و آنتی‌اکسیدان است [۱۴].

چیزی که به‌تازگی و در یکی- دو دهه اخیر موردتوجه محققان قرارگرفته است خواص ضد سرطانی و آنتی کارسینوژنیک گیاه آویشن است [۱۵]. در مطالعه‌ای که توسط همتا و همکاران انجام شد ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی آویشن باغی مسئول القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی رده 4T1 بوده و باید خواص ضد سرطانی و سایتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی را ناشی از ترکیبات فنلی آن دانست [۱۵]. همچنین مطالعات کرامتی و همکاران نیز نشان داد که عصاره هیدروالکلی آویشن باغی رشد غیرطبیعی ضایعات پیش سرطانی و کارسینوم ناشی از DMBA (۱۲-۷- دی- متیل بنزا آنتراسن) را در پروستات موش صحرایی مهار و درمان می‌کند [۱۶].

کشت سلولی یکی از روش‌های نوین مطالعه است که تقریباً در همه رشته‌های علمی نشانه‌هایی از آن یافت می‌شود. یکی از اهداف کشت سلولی مطالعه سلول‌ها از نظر نحوه رشد، نیازهای غذایی و علل توقف رشد آن‌ها است؛ بنابراین مطالعه چرخه سلولی، توسعه روش‌های رشد سلول‌های سرطانی و تعدیل بیان ژن نیاز به کشت این سلول‌ها در محیط خارج از بدن است [۴].

MCF-7 رده سلولی سرطان پستان انسان است و اولین بار در سال ۱۹۷۰ از بافت سرطانی بدخیم پستان یک زن ۶۹ ساله قفقازی که سرطان پستان در وی متاستاز کرده بود جدا شد. از آن زمان به بعد از این رده سلولی به‌عنوان مدل مناسب برای مطالعه سرطان استفاده می‌شود [۱۷].

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سمیت سلولی ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی روی رده سلولی MCF-7 انجام شد.

روش کار:

استخراج ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی

اندام هوایی شامل برگ و ساقه کلوس و آویشن دنایی از استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری و استخراج عصاره هیدروالکلی آن‌ها به روش روتاری انجام شد. برای عصاره‌گیری ابتدا برگ و ساقه گیاهان در سایه‌خشک شد. سپس توسط آسیاب مکانیکی به‌صورت پودر درآمده و آنگاه پودر گیاه به‌طور جداگانه داخل استوانه ریخته شده و حلال روی آن ریخته شد. حلال استفاده‌شده الکل اتانول ۹۰ درصد بود که با آب مخلوط شده بود. این حلال هیدروالکلی به‌اندازه‌ای استفاده شد که روی پودر گیاهان را کاملاً بپوشاند. سپس محلول حاصل در آون با ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۷۲ ساعت محلول از دستگاه خارج و از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس محلول صاف‌شده به‌تدریج و در چند نوبت در دستگاه روتاری استریک قرار داده شد تا تغلیظ شود [۴]. در نهایت ۵۰ درصد از عصاره هیدروالکلی کلوس و ۵۰ درصد از عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی با یکدیگر ترکیب کرده، در محیط DMEM حل و با استفاده از صافی ۰/۲ میکرون صاف شد. از عصاره حاصل برای تهیه دوزهای مختلف استفاده شد.

کشت سلول

این آزمایش در آزمایشگاه سلولی – تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. رده سلولی MCF-7 سرطان پستان و رده سلولی فیبروبلاست، سلول طبیعی از مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران تهیه شد. برای کشت سلول‌های MCF-7 و سلول‌های فیبروبلاست از محیط کشت DMEM حاوی 10% FBS (Fetal bovine serum) و 1%Penicillin-Streptomycin استفاده شد و تحت شرایط استاندارد انکوباتور (دمای c° ۳۷و Co2 ۵٪ و رطوبت ۹۵٪) کشت داده شدند. بعد از ۳ بار پاساژ، از سلول‌ها برای انجام مراحل بعد استفاده شد. شمارش سلولی و تعداد سلول‌های زنده با لام هموسیتومتر با استفاده از تریپان بلو (شرکت سیگما) انجام شد. به این صورت که ۰/۴ گرم از پودر تریپان بلو وزن و در ۱۰ سی‌سی آب مقطر حل و سپس صاف‌شده، در یخچال نگهداری شد. پس از تریپسینه شدن سلول‌ها ۱۰ میکرولیتر از سلول‌هایی که درون ۱ میلی لیتر از محیط کشت بودند را برداشته و ۹۰ میکرو لیتر محیط کشت همراه با ۲۰ میکرو لیتر از رنگ تریپان بلو در میکروتیوپ ریخته و خوب هموژن شد. سپس ۲۵ میکرو لیتر از آن روی لام نئوبار ریخته شد و زیر میکروسکوپ معکوس (Invert، Nikon، ژاپن) شمارش شد. این کار باید در مدت‌زمان کوتاهی انجام شود چون ممکن است سلول‌ها توسط رنگ تریپان بلو از بین بروند.

بررسی سمیت ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی با استفاده از آزمون MTT

برای اندازه‌گیری اثر سمیت سلولی ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی از آزمون MTT استفاده شد. در این روش نمک متیل تیازولیل تترازالیوم بروماید و یا به‌اختصار MTT که زردرنگ است توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال به ترکیب غیرمحلول و ارغوانی فورمازان تبدیل می‌شود. جذب نوری این ترکیب پس از حل شدن در DMSO (Dimethyl Sulfoxide)، با کمک دستگاه Eliza reader و در طول‌موج ۶۳۰-۴۹۲ نانومتر قابل‌اندازه‌گیری است [۱۸].

پس از پوشیده شدن بستر فلاسک از سلول، لایه سلول چسبنده به کف فلاسک به روش آنزیمی و با استفاده از تریپسین 0/25% Trypsin/EDTA، شرکت Bioidea جدا شد و پس از انتقال به لوله‌های آزمایش استریل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌ها با کمک پیپت پاستور در محیط تازه کشت معلق و از آن‌ها سوسپانسیون سلولی تهیه شد. برای شمارش، سلول‌هایی که روی چهارخانه مخصوص شمارش گلبول سفید لام نئوبار بودند شمارش شدند. عدد به‌دست‌آمده بر ۴ تقسیم و در عکس عامل رقت و در ۱۰۴ ضرب شد. عدد به‌دست‌آمده تعداد سلول‌ها را در یک میلی لیتر از محیط کشت نشان می‌دهد. پس از شمارش، سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای کف صاف ویژه کشت سلول، به تعداد ۱۰۴ سلول درون چاهک‌های پلیت ریخته و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از طی مدت‌زمان لازم به‌آرامی و با دقت محیط رویی برداشته شد و به همه چاهک‌ها محیط جدید و ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی با غلظت‌های ۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد [۱۹] و به چاهک‌های گروه کنترل محیط دارای سرم و فاقد عصاره اضافه شد.

سلول‌های گروه اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم به ترتیب در معرض غلظت ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ ، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی و در گروه کنترل، سلول‌های سرطانی MCF-7 و سلول‌های طبیعی فیبروبلاست در معرض محیط کشت DMEM قرار گرفتند.

پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از طی مدت‌زمان انکوباسیون، پلیت‌ها را از داخل انکوباتور بیرون آورده، محیط رویی هر چاهک به‌طور کامل به‌وسیله سمپلر برداشته شد و سلول‌ها با ۱۰۰ میکرو لیتر (Phosphate – buffered saline)PBS شسته شدند و سپس به هر چاهک ۸۰ میکرو لیتر محیط کشت و ۲۰ میکرو لیتر محلول زردرنگ MTT (شرکت سیگما، ۵۰ میلی‌گرم از پودر زردرنگ MTT، در ۱۰ میلی‌لیتر PBS حل کرده و توسط صافی ۰/۲ میکرون صاف شد) اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از طی مدت‌زمان لازم ابتدا محیط رویی به‌طور کامل برداشته شد و هر چاهک با ۱۰۰ میکرو لیتر PBS شسته و به آن‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه شد تا بلوره‌های فورمازان حل شوند، سپس تغییر رنگ حاصل توسط دستگاه Eliza reader در طول‌موج ۶۳۰-۴۹۲ نانومتر قرائت شد. به‌منظور تبدیل میزان جذب نوری (OD) به درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر استفاده و درصد حیات سلول‌ها پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه شد.

درصد توانایی زیستی = OD آزمون / ODشاهد ×۱۰۰

غلظتی از ترکیب مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش دهد به‌عنوان IC50(The half maximal inhibitory concentration) در نظر گرفته شد.

روش‌های آماری

داده‌های این مطالعه در نرم‌افزار Excel 2010 وارد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ تحلیل آماری شدند. تفاوت بین گروه‌های مختلف با حداقل $p<0/05$ معنادار تلقی شد. برای

تحلیل از آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر استفاده شد.

یافته‌ها:

اثر غلظت‌های مختلف ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی روی میزان درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی MCF-7 در زمان‌های مختلف با استفاده از روش MTT

تحلیل آماری نتایج نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد زیستایی با افزایش دوز ترکیب عصاره هیدروالکلی گیاه کلوس و آویشن دنایی در رده سلولی MCF-7 کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که درصد زیستایی از ۹۲/۲۲ درصد در غلظت ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱۴/۱۸ درصد در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید که این اختلاف از نظر آماری معنادار بود ($p<۰/۰۵$). در انکوباسیون ۴۸ ساعته نیز کاهش درصد زیستایی وابسته به دوز مشاهده شد، به‌طوری‌که درصد زیستایی از ۸۷/۱۴ درصد در غلظت ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱۲/۷۷ درصد در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت که از نظر آماری معنادار بود ($p<۰/۰۵$). در انکوباسیون ۷۲ ساعته نیز کاهش درصد زیستایی مشاهده شد (کاهش درصد زیستایی از ۷۳/۵۳ درصد در غلظت ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱۰/۶۹ درصد در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که از نظر آماری معنادار بود ($p<۰/۰۵$).

تجزیه تحلیل نتایج با استفاده از آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر اختلاف معناداری در تمام غلظت‌ها و در هر سه زمان در این رده سلولی نشان داد ($p<۰/۰۵$). بیش‌ترین اثر سمیت در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و انکوباسیون ۷۲ ساعته مشاهده شد (جدول ۱). غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول‌ها (IC50) ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی، برای سلول‌های سرطانی MCF-7 در غلظت ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

اثر غلظت‌های مختلف ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی، بر روی میزان درصد توانایی زیستی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست در زمان‌های مختلف با استفاده از روش MTT

سلول‌های طبیعی فیبروبلاست با غلظت‌های مختلف ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی (۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. نتایج حاصل از روش MTT نشان داد که ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی روی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست تأثیر چندانی ندارد (جدول ۲).

رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 بعد از ۷۲ ساعت تیمار با ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (شکل 1B) در مقابل گروه کنترل (بدون تیمار با ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی) (شکل A2) مهارشده است سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از مجاورت با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی از حالت طبیعی خارج شدند و مرفولوژی آن‌ها تغییر یافت که نشان‌دهنده اثر سمیت ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی روی این سلول‌ها است.

جدول ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی ترکیب گیاه کلوس و آویشن دنایی، بر روی میزان توانایی زیستی سلول‌های سرطانی MCF-7 در زمان‌های مختلف بر اساس روش MTT

غلظت / گروه	۰/۱۵۶	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵
۲۴ ساعت	۹۲/۲۲±۲/۱۷	۸۶/۱۱±۳/۵۳	۷۴/۷۴±۲/۲۶	۴۱/۹۶±۳/۲۶	۱۴/۱۸±۰/۸۹۸
۴۸ ساعت	۸۷/۱۴±۲/۳۲	۸۰/۰۹±۲/۱۶	۶۸/۷۹±۴/۵۵	۳۰/۹۱±۳/۰۸	۱۲/۷۷±۰/۷۴۰
۷۲ ساعت	۷۳/۵۳±۳/۵۸	۶۱/۱۵±۲/۳۷	۵۴/۵۷±۱/۷۰	۲۴/۶۳±۱/۷۰	۱۰/۶۹±۱/۲۲

*میانگین توانایی زیستی در غلظت‌های مختلف دارای اختلاف معنادار است ($p<۰/۰۵$).
** میانگین توانایی زیستی در زمان‌های مختلف دارای اختلاف معنادار است ($p<۰/۰۵$).
*** اعداد بیانگر میانگین ± انحراف معیار است.

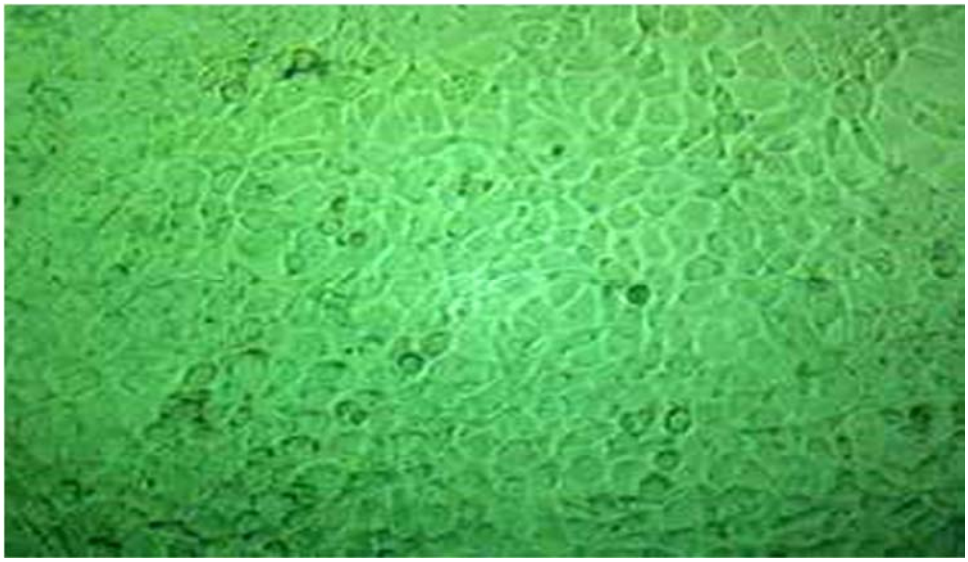
جدول ۲: تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب عصاره هیدروالکلی گیاه کلوس و آویشن دنایی روی میزان توانایی زیستی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست در زمان‌های مختلف بر اساس روش MTT

غلظت / گروه	۰/۱۵۶	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵
۲۴ ساعت	۱۰۷/۰۷±۱/۰۶	۱۰۴/۶۵±۰/۷۴	۱۰۰/۴۹±۰/۸۶	۹۵/۶۷±۱/۲۹	۹۱/۳۵±۰/۲۴
۴۸ ساعت	۱۰۱/۶۶±۲/۲۲	۹۹/۱۳±۱/۳۳	۹۴/۵۳±۱/۰۷	۹۰/۸۹±۱/۱۰	۸۵/۷۴±۱/۰۳
۷۲ ساعت	۹۹/۱۲±۰/۴۰	۹۵/۴۲±۰/۸۲	۸۹/۷۴±۱/۳۴	۸۶/۹۹±۰/۲۹	۸۲/۰۷±۰/۶۳

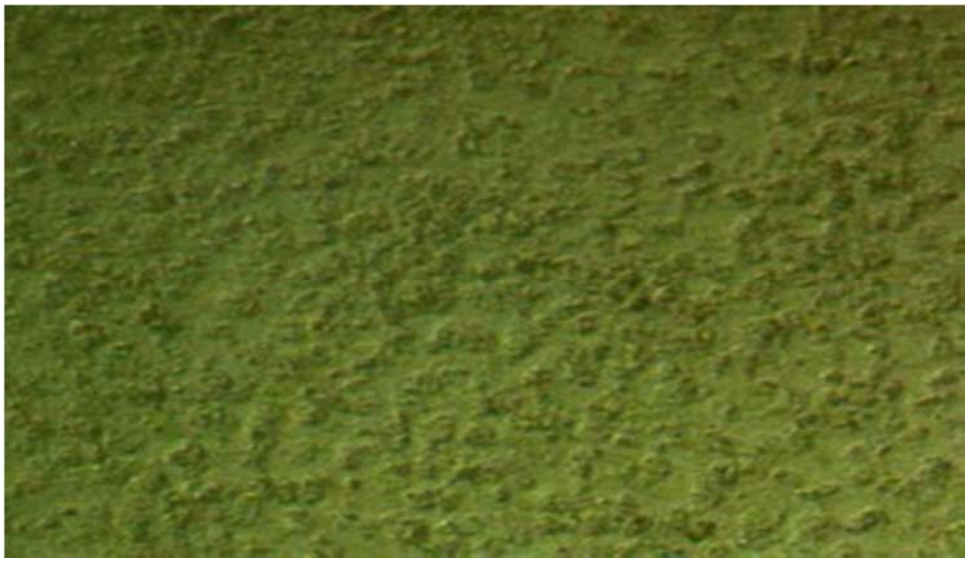
* میانگین توانایی زیستی در غلظت‌های مختلف دارای اختلاف معنادار است ($p<0/05$) فقط غلظت ۰/۱۵۶ و غلظت ۰/۳۱۲ اختلاف معنادار نداشتند ($p=0/079$) .

** میانگین توانایی زیستی در زمان‌های مختلف دارای اختلاف معنادار است ($p<0/05$).

*** اعداد بیانگر میانگین ± انحراف معیار است.



شکل A



شکل B

شکل ۱: (A) سلول‌های سرطانی MCF-7 در گروه کنترل بدون تیمار با ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی شکل (B) سلول‌های سرطانی MCF-7 بعد از ۷۲ ساعت تیمار با ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (×۱۰)

بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی با اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی MCF-7 سبب مرگ این سلول‌ها می‌شود، درحالی‌که روی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست سمیت چندانی ندارد.

بسیاری از گیاهان و ادویه‌جات دارای خاصیت فارماکولوژیک و بیوشیمیایی شامل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهاب بوده که به نظر می‌رسد در فعالیت‌های ضد بدخیمی و ضد جهش‌زایی سلولی دخالت دارند. با توجه به این‌که پیشرفت تومور ارتباط بسیار نزدیکی با التهاب و استرس اکسیداتیو دارد، ترکیبی که خواص ضدالتهابی یا آنتی‌اکسیدانی داشته باشد می‌تواند یک عامل ضد بدخیمی سلولی باشد [۲۰].

طبق تحقیقات سعیدی و همکاران و همچنین سجادی و همکاران، کرفس کوهی حاوی ترکیباتی همچون فلاونوئید (لیمونن، میرسن، کامفن، کامفور، ۳- o- متیل اتر و...)، فرولیک اسید، فتالید (Z- لیگوستئید، ۳- E- بوتیلیدن فتالید، E- لیگوستئید و ...)، کافئیک اسید، ترپنوئید (α- تریپین آل، α- پنین، β- پنین و...) و ... است [۲۱، ۲۲]. گیاه کلوس نیز به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد و اثرات آنتی‌اکسیدانی است [۷].

آویشن دنایی از جمله گیاهانی است که نه تنها کاربردهای فراوانی در طب سنتی دارد، بلکه به دلیل داشتن ترکیبات فنلی فعالیت ضد میکروبی علیه ایزوله‌های قارچی و باکتریایی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن تا حدودی تأییدشده است [۲۳]. خواص درمانی این گیاه می‌تواند به علت وجود ترکیبات موجود به خصوص فلاونویید و ترکیبات فنلی باشد [۲۴].

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای خواص بیولوژیکی متعددی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و خاصیت

ضدالتهاب هستند. این ترکیبات همچنین باعث جلوگیری یا به تأخیر انداختن آسیب‌های اکسیداتیو در چربی‌ها و دیگر مولکول‌های مهم و مانع به وجود آمدن سرطان و بیماری‌های کرونر قلب می شوند [۲۵].

بررسی‌ها نشان داده است که عصاره‌های گیاهان غنی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها با کاهش استرس‌اکسیداتیو باعث آثار حفاظتی سلول‌ها می‌شود. ترکیبات فنلی یک گروه متابولیت ثانویه آروماتیک گیاهی‌اند که به‌طور گسترده در سراسر گیاه پخش‌شده‌اند و تأثیرات بیولوژیکی متعددی چون فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی دارند [۲۶]. ترکیبات فنلی شامل ویتامین‌ها رنگ‌دانه‌ها و فلاونوئیدها، ویژگی‌های ضد جهشی و ضد سرطانی را بر عهده‌دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی در گیاهان عمدتاً ناشی از قدرت احیاکنندگی و ساختار شیمیایی آن‌هاست که آن‌ها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه می‌سازد. ترکیبات فنلی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد واکنش‌های اکسیداسیون را مهار می‌کنند [۲۷]؛ بنابراین، این احتمال وجود دارد که ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای موجود در ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی از طریق مهار رادیکال‌های آزاد باعث کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند.

نتایج تحقیقات رانا و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که عصاره آویشن باعث بهبود پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه کمک به جلوگیری از استرس اکسیداتیو می‌شود [۲۸]. همچنین یافته‌های آنجل و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله ترکیبات فنلی از عوامل مؤثر در توان سیتوتوکسیکی A.Campesteris دانسته‌اند. ترکیبات فنلی باعث محافظت سلول در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال می‌شوند[۲۹].

بررسی‌ها نشان داده که تفاوت معناداری در سه زمان تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) وجود دارد، به‌طوری‌که با افزایش زمان و افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی، اثرات سمیت سلولی روی سلول‌های سرطانی MCF-7 بیش‌تر می‌شود، درحالی‌که روی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست سمیت چندانی ندارد. نتایج این مطالعه با نتایج تحقیقات مهدیان و همکاران با عنوان اثر عصاره هیدروالکلی کلم قرمز بر مهار رشد سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) و سلول‌های نرمال فیبروبلاست HFF (Human foreskin fibroblast) مبنی بر این‌که عصاره هیدروالکلی کلم قرمز رشد سلول‌های سرطانی را به‌صورت وابسته به دوز و زمان مهار می‌کند، درحالی‌که عصاره هیدروالکلی کلم قرمز در هیچ‌یک از زمان‌ها بر سلول‌های نرمال سمیتی ندارد، همسو است [۳۰].

تحقیقات رضایی و همکاران با عنوان تأثیر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده زغال‌اخته روی سه رده سلولی MCF-7 (Human breast adenocarcinoma)، HepG2 (Liver cancer) و CHO(Normal hamster ovary) با روش MTT نشان داد این عصاره به‌صورت وابسته به دوز و زمان اثر سمیت قابل‌توجهی روی سلول‌های سرطانی دارد، درحالی‌که سمیت چندانی روی سلول‌های نرمال ندارد. نتایج این مطالعه با یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد [۳۱].

این نتایج می‌تواند گام ابتدایی در بررسی و شناسایی ترکیبات ضد سرطانی باشد. به‌هرحال مطالعات نشان می‌دهند که ترکیبات گیاهی و مشتقات آن‌ها می‌توانند بخشی از پروتکل‌های

استاندارد درمان سرطان به‌حساب آیند و سلاح مؤثری برای پیشگیری و درمان سرطان باشند. با توجه به تنوع و گستره زیاد گیاهان، محققان راه درازی برای تحقیق در این زمینه پیش رو دارند.

نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی با اثر ضد سرطانی وابسته به دوز و زمان روی سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود، به‌طوری‌که به‌تدریج و با افزایش زمان و در دوزهای بالاتر رشد سلول‌های سرطانی بیشتر مهار می‌شود. ترکیب عصاره هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی روی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست تأثیر چندانی ندارد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از اساتید محترم و مسئولین آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به منظور فراهم نمودن امکان انجام این تحقیق سپاسگزاری می شود.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Ghavami GH, Sardari S, Shokrgozar MA. Anticancerous potentials of Achilleaspecies against selected cell lines. J Med Plant Res 2010; 4(22): 2411-2417.
2. Kruk J, Aboul-Enein Hy. Psychological stress and the Risk of breast cancer: A case-control study.Cancer Detect Prev 2004; 28(6): 399-408.
3. Davoodi R, EsmaeilzadeBahabadi S, Najafi Sh, et al. Effect of hydro alcoholic extract of citrulluscolocynthis fruit on caspase 3 gene expression in MCF-7 breast cancer cell line. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(5): 508-518. (Persian)
4. Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, et al. Evaluation of anti-cancer effect of PeganumharmalaL hydroalcholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line (HeLa). J Shahrekord Univ Med Sci 2014; 16(4): 1-8. (Persian)
5. Abdullaev F. Plant-derived agents cancer. J Pharmacol 2001; 15(3): 345-54.
6. Shakerian A, Sohrabi M, Ghasemipirbalouti A. Effect of Kelussia odoratissma Mozaff Oil Essential in Sensory Properties and Shelf Life of Set Yogurt. JHD 2012; 3(1): 41-48. (Persian)
7. Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff in model and food systems. Food Chemistr 2007; 105 (1): 57-64.
8. Rabbani M, Sajjadi S.E, Sadeghi M. Chemical composition of the essential oil from Kelussia odoratissima Mozaff. and the evaluation of its sedative and anxiolytic effects in mice. Clin 2011; 66(5): 843-848.
9. Jahantab E, Sepehri A, Barani H, et al. An introduction on the ndangered medicinal species of Mountain's Kelavs (KelussiaOdoratissimaMozaff). J Rangeland Sci 2011; 2(1): 409-415.
10. Golparvar A, Ghasemipirbalouti A, Zinaly H, et al. Effect of Harvest Times on Quantity (Morphological) and Quality Characteristics of Thymus daenensis Celak In Isfahan. JHD 2012; 2(4): 245-254. (Persian)
11. Karimi A, Ghasemipirbalouti A, Malekpoor F, et al. Evaluation of Ecotype and Chemotype Diversity of Thymus Daenensis Celak. On Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari Provinces. JHD 2010; 1(3): 1 – 10. (Persian)
12. GhasemiPirbalouti A, Hashemi M, Ghahfarokhi F.T. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated Thymus daenensis Celak and Thymus vulgaris L. Ind Crop Prod 2013; 48: 43-48.
13. Barazandeh M, Bagherzadeh K. Investigation on the Chemical Composition of the Essential of Thymus daenensisCelak from Four Different Regions of Isfahan Province. JMP 2007; 3 (23):15-19. (Persian)
14. GhasemiPirbalouti A, Samani M.R, Hashemi M, et al. Salicylic acid affects growth, essential oil and chemical compositions of thyme (Thymus daenensis Celak) under reduced irrigation. Plant Growth Regul 2014; 72(3) : 289-301.
15. Hamta A,Ghazaghi S. The study of Thymus vulgaris Cytotoxicity effects on breast cancer cell's line. J Sabzevar Univ Med Sci 2014; 21(1):122-130. (Persian)
16. Keramati k, Sanaie k, Babakhani A, et al. Effect of Thymus Vulgaris hydro- alcoholic extraction on DMBA induced prostate cancer Wistar rat. Res Med 2011; 35(3): 135-140. (Persian)
17. Osborne CK, Hobbs K, Trent JM. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. Breast Cancer Res Treat 1987; 9(12):111-121.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
19. Nemati F, Eslamijadidi B, Talebidarabi M. Cytotoxicity Effects of Bishop's flower (AmmiMajus) Extract on The Cancer Cell Lines Hela and MCF-7. J Anim Biol 2013; 5(3): 59-66. (Persian)
20. Afshari J. Brook A. Moheghi N. The cytotoxic effect of zingiberafficinale in breast cancer(MCF7) cell line. Ofogh-e-Danesh 2011; 17(4): 28-33. (Persian)
21. Saeedi KA, Omidbaigi R. Chemical characteristics of the seed of Iranian endemic plant KelussiaodoratissimaMozaff. Chem Nat Compounds 2009; 4: 547-913.
22. Sajjadi SE, Shokoohinia Y, Moayedi NS. Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of Kelussia odoratissima Mozaff. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2012

; 7(4):159-162.
23. Sefidkon F, Ahmadi Sh. Essential oil of SaturejakhuzistanicaJamzad. J Essent Oil Res 2000; 12(4): 427-428.
24. Alavi L, Barzegar M, Jabbari A, et al. Effect of Heat Treatment on Chemical Composition and Antioxidant Property of Thymus daenensis Essential Oil. J Med Plants 2010; 9(35):129-138.
25. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, et al. Bioactive compounds food: their role in the perevention of cardiovascular diseasans cancer. Am Med 2002; 113(9): 71-88.
26. Kumaran A, Karunakaran R.J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. Food Chem 2006; 97(1): 109-114.
27. Shun YM, Wen YH, Yong CY, et al. Two Benzyl Dihydroflavones from PhellinusIgniarius. Chinese Chem Lett 2003; 14(8): 810-13.
28.Rana P, Soni G. Antioxidant potential of thyme extract: alleviation of Nnitrosodiethylamine - in duced oxidative stress. Hum ExpToxicol 2008; 27(3): 215- 21.
29. Angel S, Morana A, Salvatore A, et al. Protective effect of polyphenols from Glycyrrhizaglabra against oxidative stress in Caco-2 cells. J Med Food 2009; 12(6); 1326 –33.
30. Mahdian D, Hosseini A, Mousavi H, et al. The Evalution of the Effects of Hydro-Alcolic Extract of Brassica Olerace (Red cabbge) on Growth inhibition and Apoptosis indution in Breast cancer cell line MCF-7. IJOGZ 2015; 18(151):1-11. (Persian)
31. Rezaei F, Shokrzadeh M, Majd A, et al. Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of Cornus mas L.fruit on MCF7, HepG2 and CHO cell line by MTTAssay. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(113):130-138. (Persian)

Original Article

Cytotoxic effect of hydroalcholic extracts of Kelussia odaratissma Mozaff and Thymus daenesis Celak on MCF-7 cancer cell line

Fatemeh Sadeghi Samani[1], Hoseein Sazegar [*1], Abdollah Ghasemi Pirbalouti[2]

Received: 04/18/2016 Revised: 06/19/2016 Accepted: 08/7/2016

1. Dept of biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran
2. Dept of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.2, Summer 2016

Pars J Med Sci 2016; 14(2):57-65

Abstract

Introduction:
Breast cancer is the second most common cancer after lung cancer in women. Given that herbal preparations have long been used to treat cancer, this study aimed to investigate the cytotoxic effect of hydroalcholic extract of Kelussia odaratissma Mozaff and Thymus daenesis Celak on MCF-7 cancer cell line.

Materials and methods:
MCF-7 cancer cells and normal fibroblasts were cultured in DMEM medium containing Fetal Bovine Serum (FBS) and antibiotic. The cells were exposed to different doses of hydroalcholic extract of Kelussia odaratissma Mozaff and Thymus daenesis Celak (0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 mg/ml) and were incubated for 24, 48 and 72 hours. After the incubation period, modified colorimetric MTT method was used to determine the cellular toxicity of the extract.

Results:
The results of the MTT test showed that hydroalcholic extract of Kelussia odaratissma Mozaff and Thymus daenesis Celak had dose-dependent and time-dependent anti-cancer effect on MCF-7 cancer cells. The highest percentage of cell death was observed with the highest concentration of the extract and after 72 h of incubation ($p< 0.05$). The extract did not show significant cytotoxicity on normal fibroblasts.

Conclusion:
Hydroalcholic extract of Kelussia odaratissma Mozaff and Thymus daenesis Celak has cytotoxic effects on MCF-7 cancer cells; however, this extract does not have any cytotoxic effects on normal fibroblasts. It appears that this extract can be used for cancer treatment with further research.

Keywords: Kelussia odaratissma Mozaff, Thymus daenesis Celak, MCF-7, MTT assay

* Corresponding author, Email: hoseinsazgar@yahoo.com