بررسی اثرات عصاره گیاه زیرفون (*Tilia plathyphyllos*) بر بیان ژن کاسپازهای ۳ و ۹ در رده سلول سرطانی غدد پستانی سگ (CF41.Mg)

زهره مستحصن[۱]، پژمان مرتضوی[۲*]

۱-دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲-دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات: sp.mortazavi@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۱/۳۱ پذیرش نهایی: ۹۶/۷/۱۲)

چکیده

سرطان پستان در سگ و گربه بعد از تومورهای پوستی، شایع‌ترین نوع سرطان می‌باشد. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز سبب ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی می‌شود. کاسپازهای ۳ و ۹ به عنوان کاسپازهای اجرایی و القاگر نقش مهمی در فرآیند آپوپتوز دارند. این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره گیاه زیرفون بر بیان ژن کاسپازهای ۳ و ۹ در رده سلول سرطانی غدد پستانی سگ انجام شد. سلول‌های سرطانی غدد پستانی سگ (cf41.mg) در مجاورت دوزهای ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و۱۰۰ میکرومولار از عصاره زیرفون در محیط کشت به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پاساژ داده شدند. جهت بررسی میزان سلول‌های زنده پس از انجام پاساژ از روش MTT (microculture tetrajolium test) استفاده شد. برای فهم مکانیسم‌های درگیر در القای مرگ سلولی در زمان های مذکور، RNA استخراج و CDNA سنتزشده و میزان بیان ژن کاسپازهای ۳ و ۹ با استفاده از پرایمرهای مختص به آنها به روش real time PCR و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت ضدسرطانی این عصاره پس از ۴۸ ساعت و با دوز ۲۵ میکرومولار بیشترین تاثیر را داشت. نتایج آزمون RT-PCR حاکی از بیان ژن کاسپازهای ۳ و ۹ در نمونه‌های تیمارشده در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بود. همچنین میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار و بیان کاسپاز ۹ در دوز۱۰ میکرومولار بیشتر از بقیه بود. نتایج حاصل از این مطالعه تأییدکننده اثر مهاری عصاره گیاه زیرفون بر تکثیر رده سلول‌های سرطانی غدد پستانی سگ (cf41.mg) می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: عصاره گیاه زیرفون، کاسپاز ۳، کاسپاز ۹، سلول‌های سرطانی غدد پستانی سگ.

مقدمه

سرطان گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه آن‌ها رشد سلولی تنظیم‌نشده و تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی با مکان اولیه به نقاط دیگر بدن می‌باشد. نکته‌ای که قابل توجه می‌باشد، این است که سرطان تنها یک بیماری نیست، بلکه مجموعه‌ای از اختلالات متفاوتی است که تنظیم رشد سلولی را مختل می‌کنند (Pecorino, 2012). اساس ایجاد تمام نئوپلاسم‌ها، فقدان پاسخ به مهارکننده‌های طبیعی رشد و همچنین فقدان کنترل چرخه سلولی است (Pecorino, 2012). آپوپتوز کلمه یونانی است و به معنی برگ‌ریزان می‌باشد. در اغلب منابع دو واژه آپوپتوز و مرگ برنامه‌ریزی شده مترادف هم به کار برده شده و عده‌ای نیز آپوپتوز را مهم‌ترین نوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی قلمداد کرده‌اند. آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر و آسیب‌دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هومئوستاز بافتی ضروری است. کاسپاز ها نقش محوری در شروع و مرحله اجرایی آپوپتوز ایفا می‌کنند (Cassali *et al*., 2011).

در جوامع انسانی ۱۸ درصد سرطان‌های زنان مربوط به سرطان پستان و در سگ و گربه، بعد از تومورهای پوستی، شایع‌ترین نوع سرطان می‌باشد. شیوع آن در سگ سه برابر انسان است. میزان وقوع این تومور، ۲۰۵ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ سگ در سال در بریتانیا گزارش شده است (Ruberte *et al*., 1990). امروزه تومورهای پستان، ۵۰ درصد کل تومورهای سگ‌های ماده را شامل می‌شوند که ٤١ تا ۵۳ درصد آن‌ها به شکل بدخیم تظاهر می‌یابند. عوامل خطر تومور پستان سگ شامل سن، هورمون‌ها، نژاد و رژیم غذایی و چاقی می‌باشد (Slatter, 2003).

تاثیر مواد آنتی‌اکسیدان روی رادیکال‌های آزاد با افزایش سن و بیماری‌هایی نظیر سرطان اثبات شده است. سلول‌های سرطانی، مقدار زیادی از آنتی‌اکسیدان را به‌دلیل از دست دادن مکانیسم کنترل هومئوستاز در خود جمع‌آوری می‌کنند ولی سلول های سالم، قادر به ذخیره حجم زیادی از آنتی‌اکسیدان در خود نیستند. تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول‌های سرطانی مانع از انجام واکنش‌های اکسیداتیو در جهت تولید انرژی می‌شود. تجمع بیش از حد مواد غذایی درون سلولی در سلول‌های سرطانی سبب وقوع تغییرات بیشتری در سلول می‌شود. این تغییرات سبب افزایش آهنگ مرگ سلول‌های سرطانی و کاهش تزاید سلولی و تمایز آن می‌شود.

داروهای گیاهی به علت عدم وجود عوارض جانبی، اهمیت بیشتری در پیشگیری از انواع سرطان دارند (Zargari, 1989). مطالعات زیادی درخصوص اثرات محافظتی ترکیبات طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی در مدل‌های حیوانی انجام شده است. گیاه زیرفون (Tiliacea) با نام علمی (*Tilia platyphyllos*) و نام انگلیسی Female line از تیره پنیرکیان (Malvacea) و راسته پنیرک‌سانان (Malvales) می‌باشد. تاکنون ۳۵ جنس و ۳۵۰ گونه از این خانواده شناسایی شده‌اند که عمدتاً در نواحی گرمسیری می‌رویند. مواد مؤثره این گیاه که به شکل ترکیبات موسیلاژی است در سلول‌های خاصی ساخته و ذخیره می‌شوند. گل‌های زیرفون دارای مواد موسیلاژی، مقدار کمی اسانس، فلاوون گلیکوزید و مقادیر بسیار کمی ساپونین می‌باشند که همین

فلاوونوئیدهای موجود در این گیاه می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و خاصیت ضدسرطانی داشته باشند(Zargari, 1989). بر این اساس در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر عصاره گیاه زیرفون بر بیان ژن کاسپازهای ۳ و ۹ در رده سلول سرطانی غدد پستانی سگ در محیط کشت سلولی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده و کلیه مراحل کار در آزمایشگاه کشت سلول دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام گرفت.

برای تهیه عصاره، برگ گیاه زیرفون از عطاری‌های سطح شهر تهران خریداری و توسط آزمایشگاه هرباریوم مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات تأیید گردید. برگ‌ها در محیط آزمایشگاه در سایه و دمای اتاق، ۲±۲۲ درجه سلسیوس خشک گردیدند. در مرحله بعد برگ‌ها به‌وسیله آسیاب به صورت پودر درآمدند. به منظور تهیه عصاره به روش خیساندن، ابتدا ٤٠ گرم از پودر به داخل فلاسکی که با فویل پوشانیده شده بود، ریخته شد و روی آن ٤٠٠ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درجه (به نسبت ۱۰ به ۱) اضافه شد و روی شیکر به مدت ٤٨ ساعت با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از آن مایع داخل فلاسک با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. مایع صاف‌شده جهت تغلیظ، درون فلاسک دستگاه روتاری ریخته شد و با دمای ٤٥ درجه سلسیوس و با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه و فشار کم، محلول تغلیظ گشته تا به حجم تقریبی ۳۰ میلی‌لیتر رسید. سپس مایع درون پتری‌دیش ریخته شد و در دمای آزمایشگاه به مدت ٢٤ ساعت قرار گرفت تا خشک شد. جهت ادامه کار در ظرفی تیره ریخته شد و تا شروع آزمایش در دمای ٤ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید.

در مرحله بعد رده سلول سرطانی پستان سگ (CF41.Mg) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در داخل فلاسک به آزمایشگاه منتقل و در انکوباتور نگه‌داری شد. سپس محیط کشت (high glucose) DMEM (dulbecco's modified eagle's medium)، محلول tripsin–EDTA ۲۵ درصد و PBS (phosphate buffer solution) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (Sigma-USA) ساخته شد.

رده سلولی سرطانی در محیط کشت DMEM که محتوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی همراه با ۱۰۰ میکرولیتر جنتامایسین بود، کشت داده شد. سلول‌ها در انکوباتور حاوی CO2 ٥ درصد، اکسیژن ۹۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شده و محیط کشت سلول‌ها بر حسب نیاز و به طور میانگین هر سه روز یک‌بار تعویض و زمانی که به ۸۵ درصد هم بارزی (confluency) رسید، پاساژ داده شد.

در زیر هود محیط کشت داخل فلاسک دور ریخته شد و دو نوبت با محلول PBS شستشو داده شد. پس از آن محلول tripsin–EDTA که از قبل گرم شده بود، به آرامی روی سلول‌ها ریخته و تکان داده شد و پس از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک جهت جلوگیری از آسیب خود سلول‌ها با تریسپین از محلول آنتی‌تریسپین استفاده گردید. به این صورت که محیط کشت دارای FBS (fetal bovine serum) به فلاسک اضافه شد. سپس چندین بار محلول به کمک سرسمپلر داخل

فلاسک کشیده شد و به فالکون ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد. در مرحله بعدی سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ و محلول مایع رویی دور ریخته شد ،سپس محیط کشت اضافه گردید و بعد از آن محلول حاصل به کمک لام نئوبار و میکروسکوپ معکوس مورد مشاهده قرار گرفت. زمانی که تراکم سلول‌ها به ۸۵ درصد رسید، سلول‌ها به فلاسک جدید منتقل و این عمل پاساژ دادن چندین بار تکرار گردید. آزمایش باکتری، قارچ و مایکوپلاسماهای سلول‌ها در فلاسک هم منفی بود. این سلول‌ها به طور کلی کندرشد و بسیار حساس بوده و نیاز به بررسی روزانه و در صورت لزوم تعویض محیط کشت داشتند. جهت ارزیابی کیفی سلول‌ها از نظر مورفولوژی (میزان چسبندگی بر بستر) و میزان گرانولر شدن سیتوپلاسم و هسته بررسی شدند.

سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با دانسیته سلولی ۳۰۰۰۰ سلول بر میلی‌لیتر (که بر اساس رنگ‌سنجی با تریپان‌بلو و شمارش در لام هموسیتومتر انجام گرفت)، کشت داده شد و در دو گروه کلی شامل گروه کنترل بدون اضافه کردن هیچ دارویی در سه بازه ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت و گروه تیمار با عصاره زیرفون با پنج دوز ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در سه بازه ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور ارزیابی اثر مهاری عصاره زیرفون روی زیست‌پذیری سلول‌های CF41.Mg از آزمون MTT (microculture tetrajolium test) استفاده شد. جهت انجام این آزمایش، محلول MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت هر خانه پلیت اضافه شد و ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس محیط خارج و رسوب در ایزوپروپانول حاوی ۰/۰۸ درصد اسید کلریدریک (HCL) حل و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA-reader (مدل SCO GmbH Reader MPR1، شرکت SCO، ساخت کشور آلمان) خوانده شد. در نهایت درصد سلول‌های زنده با فرمول: نسبت ODexp به ODcon ضربدر ۱۰۰، محاسبه گردید. ODexp و ODcon به‌ترتیب جذب نوری گروه مواجهه‌یافته و گروه کنترل می‌باشند. میزان جذب به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است.

برای فهم مکانیسم‌های درگیر در القای مرگ سلولی، به ترتیب پس از زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت، RNA آن‌ها طبق دستورالعمل رایج، استخراج گردید. سپس مراحل تبدیل RNA به cDNA، انجام گرفت. جهت تبدیل RNA به cDNA از کیت Synthesis Kit Revert Aid First Strand cDNA (شرکت فرمنتاز، ایالت متحده آمریکا) استفاده شد. پس از سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن‌های درگیر در آپوپتوز، ژن کاسپازهای ۳ و ۹ انتخاب گردید و به منظور اعتبارسنجی آزمون، از ژن کنترل S26 (که در تمام سلول‌ها بیان می‌گردد) استفاده گردید. بدین منظور، از پرایمرهای جدول ۱ در آزمون RT-PCR استفاده شد، تا با استفاده از این آزمون به‌صورت کمی، میزان بیان ژن‌ها در هر کدام از گروه‌های آزمایش مشخص گردد. لازم به ذکر است با توجه به آنکه بیان ژن s26 به عنوان ژن کنترل در آزمون RT-PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد، در آزمون کمی real time مورد استفاده قرار نگرفته است (Kim *et al*., 2012).

جدول ۱- ترادف نوکلئوتیدی مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه

پرایمر	ترادف (5´ ⟶ 3´)	اندازه باند (bp)
S26	Forward: CGTGCTTCCCAAGCTGTACGTGA Reverse: CGATTCCGGACTACCTTGCTGTG	۷۵
caS3	TTCATTATTCAGGCCTGCCGAGG Reverse: TTCTGACAGGCCATGTCATCCTCA	۸۳
caS9	TCAGTGACGTCTGTGTTCAGGAGA Reverse: TTGTTGATGATGAGGCAGTAGCCG	۹۷

طبق دستورالعمل، بعد از تهیه مواد در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری به همراه شاهد مثبت و منفی (شاهد مثبت شامل نمونه استخراج‌شده از موش صحرایی و در شاهد منفی به جای cDNA، آب مقطر به مواد PCR افزوده شد) به دستگاه Thermo cycler (مدل Block assembly 96G، شرکت Analytik jena، کشور آلمان) منتقل شد. پس از اتمام کار دستگاه thermo cycler محصول RT-PCR به روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد برده شد. برای بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر از آزمون real time-PCR استفاده گردید. در این روش نیز از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد و محتویات real time -PCR master mix طبق جدول ۲ اضافه گردید. پس از انتقال به دستگاه thermo cycler طبق برنامه زمانی و دمایی جدول ۳، PCR انجام شد.

جدول ۲- محتویات real time-PCR master mix به ازای یک نمونه جهت بررسی یک ژن.

ماده	میزان بر اساس میکرولیتر
Master mix	۱۲/۵
آب مقطر	۸/۵
Forward Primer	۰/۵
Reverse Primer	۰/۵
cDNA	۳
حجم کل	۲۵

جدول ۳- برنامه زمانی و دمایی آزمون Real Time-PCR برای ژن‌ها

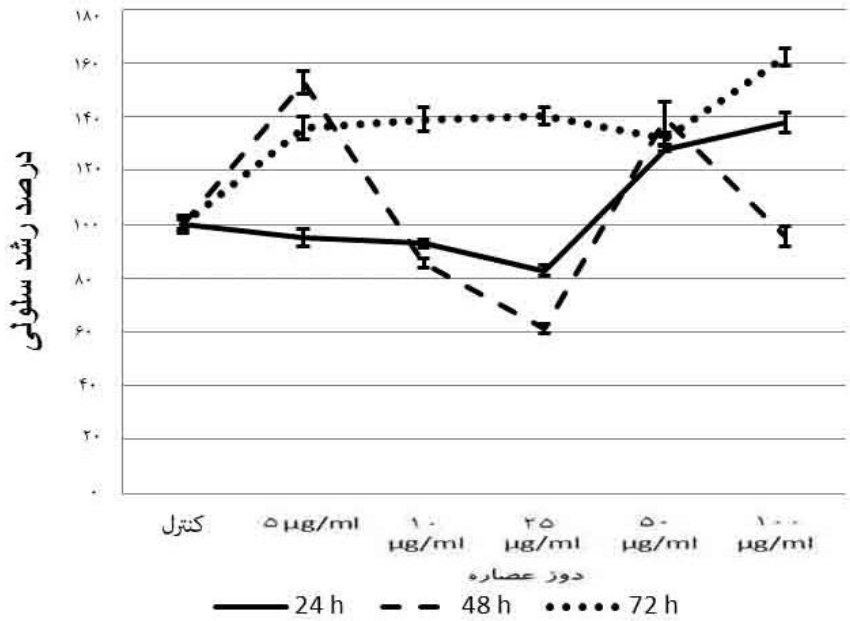
مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
UNG treatment[1]	۵۰ درجه سلسیوس	۲ دقیقه	۱
Initial denaturation and polymerase activation	۹۵ درجه سلسیوس	۲ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵ درجه سلسیوس	۱۵ ثانیه	۵۰-۴۰
Annealing and elongation	۶۵-۶۰ درجه سلسیوس[2]	۱ دقیقه[3]	۵۰-۴۰

۱-چرخش تکاملی مرحله ۱ تنها در صورتی لازم است که UNG (اوراسیل-ان-گلیکوزیلاز) تیمار اعمال شود.۲-دمای اتصال بستگی به درجه ذوب پرایمرها و پروب DNA استفاده شده، دارد.۳-زمان بسط بستگی به طول قطعه دارد (۱ دقیقه برای قطعه ۵۰۰ جفت باز).

- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس‌آزمون دانت (Dunnett) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ مورد تحلیل آماری قرار گرفت. نمودارها از طریق نرم‌افزار sigmaplat رسم شدند و $p<۰/۰۵$ به‌عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

– **آزمون MTT**: نتایج آزمون MTT نشان داد که عصاره گیاه زیرفون توانسته در دوزهای مختلف باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی شود. نتایج این بررسی در نمودار ۱ نشان داده شده است.



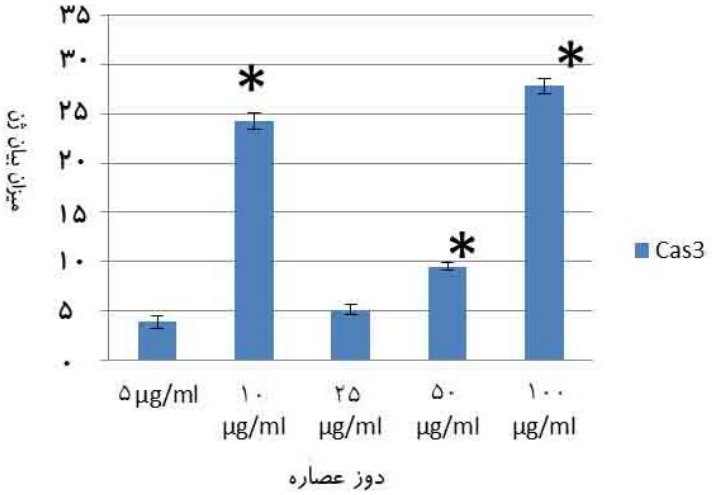
نمودار ۱– مقایسه تاثیر دوزهای مختلف عصاره زیرفون در ساعت های مختلف کشت در آزمون MTT.

مقایسه درصد رشد سلولی در دوره‌های زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد که عصاره زیرفون با دوز ۲۵ mg/ml در زمان ٤۸ ساعت بیشترین تاثیر را داشته و موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی شده است.

– **آزمون RT-PCR**: در آزمایش RT-PCR، ژن‌های Caspase3، Caspase9 و s26 در تمام گروه‌های کنترل و درمان تحت مطالعه در ژل آگارز در بالاتر از bp ۵۰، بیان گردید (شکل ۱).

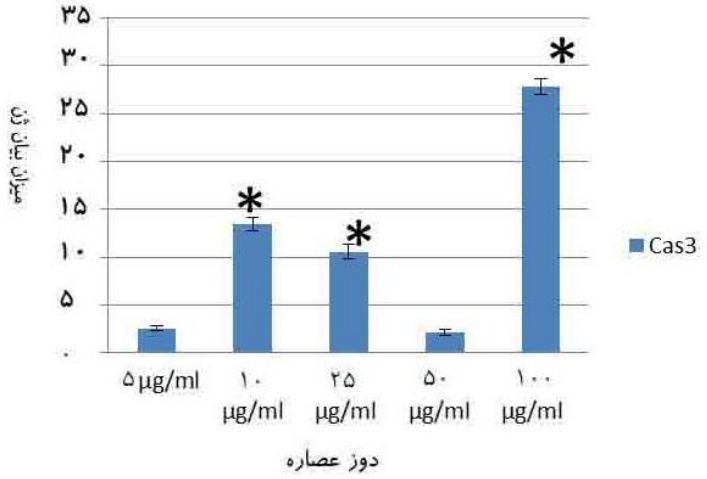
شکل ۱- بیان ژن‌های Cas3 ، Cas9 و S26 در گروه با غلظت mg/ml ۲۵ در ٤٨ ساعت (C: نشان‌دهنده کنترل منفی است).

- **آزمون Real Time-PCR**: میزان بیان ژن‌های Cas3 و Cas9 در نمودارهای ۲تا ۷ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد بیان ژن Cas3 به عنوان یک ژن اجرایی آپوپتوز و Cas9 به‌عنوان یک ژن القاءکننده آپوپتوز در ٤٨ ساعت پس از درمان با عصاره زیرفون با دز mg/ml ۲۵ نسبت به بقیه گروه‌ها بیشتر بوده است که دقیقاً مطابق با آزمون MTT می‌باشد.

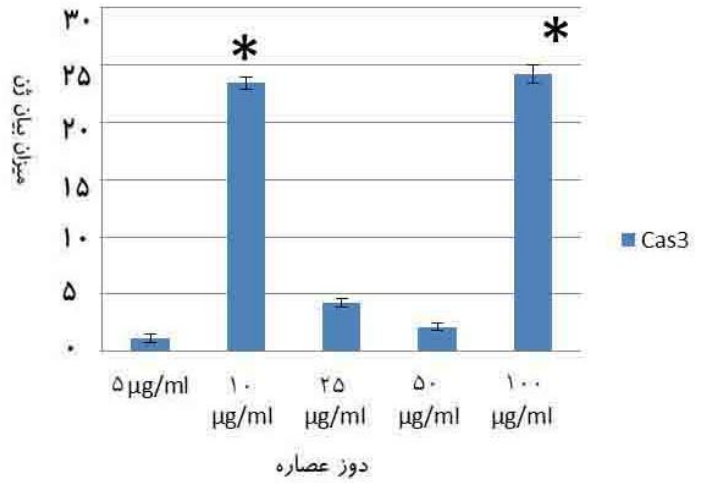


نمودار ۲- مقایسه بیان ژن کاسپاز ۳ در دوزهای مورد مطالعه طی مدت زمان ٢٤ ساعت به روش Real Time-PCR.

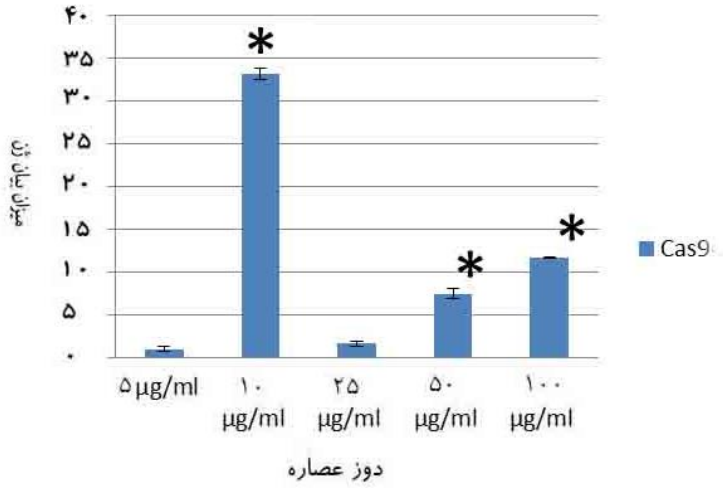
(*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در $p<۰/۰۵$ می‌باشد).



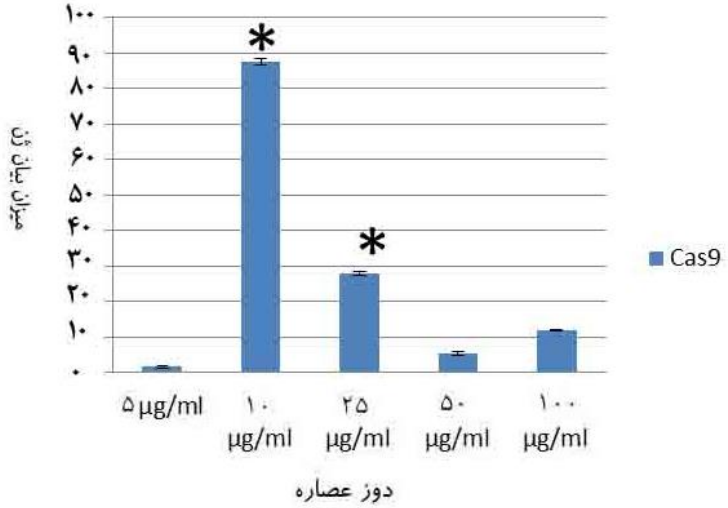
نمودار ۳- نمودار مقایسه ای بیان ژن کاسپاز ۳ در دوزهای مورد مطالعه طی مدت زمان ٤٨ ساعت به روش Real Time PCR (*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در $p<۰/۰۵$ می‌باشد).



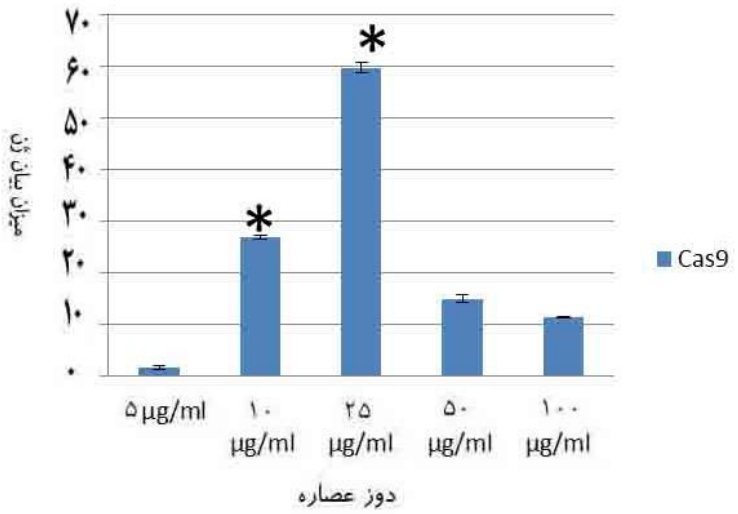
نمودار ٤- مقایسه بیان ژن کاسپاز ۳ در دوزهای مورد مطالعه طی مدت زمان ۷۲ ساعت به روش Real Time-PCR (*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در $p<۰/۰۵$ می باشد).



نمودار ۵- مقایسه بیان ژن کاسپاز ۹ در دوزهای مورد مطالعه طی مدت زمان ۲٤ساعت به روش Real Time-PCR
(*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در $p<۰/۰۵$ می‌باشد).



نمودار ٦- مقایسه بیان ژن کاسپاز ۹ در دوزهای مورد مطالعه طی مدت زمان ٤٨ ساعت به روش Real Time -PCR
(*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در $p<۰/۰۵$ می‌باشد).



نمودار ۷- مقایسه بیان ژن کاسپاز ۹ در دوزهای مورد مطالعه طی مدت زمان ۷۲ ساعت به روش real time PCR
(*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در $p<۰/۰۵$ می‌باشد).

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره گیاه زیرفون بر بیان ژن کاسپازهای ۳ و ۹ در رده سلولی سرطانی غدد پستانی سگ صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده فعالیت ضدسرطانی عصاره گیاه زیرفون بود که این تاثیر پس از ٤٨ ساعت و با دوز ۲۵ میکرومولار بیشتر از دوزهای دیگر بود. هم‌چنین میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ و بیان کاسپاز ۹ در دوز۱۰ میکرومولار بیشتر از بقیه بود. نتایج حاصل از این بررسی تاییدکننده اثر مهاری عصاره گیاه زیرفون بر تکثیر رده سلولی CF41.MG می‌باشد.

نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری و درمان سرطان‌ها توسط مطالعات بسیار گزارش شده است. در این مطالعه همان‌طور که گفته شد به بررسی اثر عصاره گیاه زیرفون به عنوان عامل آنتی‌اکسیدان طبیعی بر تکثیر رده سلولی سرطان پستان سگ در محیط *in vitro* پرداخته شد. مطالعات اخیر به خوبی نشان داده‌اند که متابولیت‌های اکسیژن فعال در رادیکال‌های آزاد مثل آنیون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و ... باعث تغییرات اسید نوکلئیک و پروتئین ها شده و به عنوان اتیولوژی شیوع سرطان مطرح می‌باشند (Sefidabi *et al.*, 2016). هم‌چنین، پیشرفت سرطان پستان وابسته به درجه استرس اکسیداتیو و به‌خصوص عدم تعادل بین گونه‌های اکسیژن فعال و دفاع آنتی‌اکسیدانی است (Sefidabi *et al.*, 2016).

گونه‌های اکسیژن فعال در طول متابولیسم استرادیول‌ها، چربی‌های غیراشباع و اتانول تولید می‌شوند. در شرایط طبیعی بین تولید رایکال های آزاد و تخریب آن با کمک سیستم آنتی‌اکسیدان سلولی تعادل ثابتی وجود دارد. هرگونه عدم تعادل بین سطح اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان ها باعث آسیب DNA و پیشرفت سرطان می‌شود (Sefidabi *et al.*, 2016).

از طرفی گیاهان سابقه‌ای طولانی در درمان بیماری‌ها و سرطان‌ها دارند. به مرور زمان مواد مغذی شفابخش و دارای خاصیت ضدسرطانی از گیاهان استخراج شده است. اولین تحقیق در زمینه عوامل ضدسرطانی گیاهی در سال ۱۹۵۰ زمانی انجام شد که وینکاآلکالوئیدها «وینکریستین و وینلاستین» کشف و پودوفیلوتوکسین‌های سایتوتوکسیک از سلول‌ها جدا شدند (Sefidabi *et al*., 2016).

در رابطه با نقش آنتی‌اکسیدان ها برای مبارزه با این اکسیدان‌ها، مطالعات زیادی صورت گرفته است. آنتی‌اکسیدان‌ها با منشأ گیاهان دارویی ممکن است اثر خود را بر سیستم‌های بیولوژیکی از طریق مکانیسم های مختلفی اعمال کنند. بسیاری از اکسیدان‌هایی که در تعدادی از بیماری‌ها نقش داشته‌اند، زمانی که در معرض آنتی‌اکسیدان‌ها قرار گرفته‌اند، میزان آسیب به سیستم‌های بیولوژیکی را کاهش داده‌اند. گیاهان دارویی مقادیر قابل توجهی از آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر فلاونوئیدها، فنول‌ها، ترکیبات پلی‌فنولی و آلکالوئیدها را تولید می‌کنند که بدن را از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Sefidabi *et al*., 2016).

نتایج بررسی‌های انجام‌شده حاکی از آن است که گیاه زیرفون حاوی فلاونوئیدها می‌باشد (Zargari, 1989). فلاونوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند و مطالعات اخیر نشان داده‌اند که حضور فلاونوئیدها باعث القای روند آپوپتوز در لوسمی و مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات در انسان شده است (Pecorino, 2012). با توجه به روش‌های نوین درمان سرطان و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی از جمله بروز بیماری‌های التهابی و ... استفاده از گیاهان دارویی در پیشگیری و درمان این بیماری‌ها مطرح می‌باشد. از طرفی گیاهان دارویی به عنوان یک منبع بالقوه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مثل فلاونوئیدها مطرح بوده که توانایی بسیار خوبی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد دارند و می‌توانند با القاء روند آپوپتوز باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی شده و از عوامل کاهش‌دهنده ابتلا به سرطان محسوب می‌شوند (Zargari, 1989). اثرات انواع مواد شیمیایی گیاهی خوراکی (phytochemicals) به‌عنوان عوامل محافظتی علیه سرطان در بسیاری از مدل‌های حیوانی و کشت سلولی نشان داده شده‌اند. خواص پیشگیری‌کننده شیمیایی و همچنین فعالیت‌های آنتی‌اکسیداتیو و ضد التهابی بسیاری، از عصاره گیاه زیرفون گزارش شده است (Zargari, 1989). در دانشگاه بوئنوس آیرس (Buenos Aires) آرژانتین در سال ۲۰۱۲ عملکرد آنتی‌پرولیفراتیو عصاره زیرفون بر لنفوسیت‌های توموری نشان داده شده است (Brizi *et al*., 2012).

ماراسینی و آنسینی در سال ۲۰۱۱ در دانشگاه رزکو (Rezko) نیز با آزمایش HPLC (high-performance liquid chromatography) روی عصاره گیاه زیرفون به این نتیجه رسیدند که فلاونوئیدهای موجود در این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و به عنوان یک پاک‌کننده انواع اکسیژن فعال به‌خصوص پراکسید هیدروژن و آنیون پراکسید عمل می‌کند. عصاره استخراج‌شده به طور انتخابی فعالیت آنتی‌پرولیفراتیو روی رده سلولی لنفوما را نشان داده است که از این نظر با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (Marrassini and Anesini, 2011). ایشان نشان دادند که تاثیرات عصاره بر رده‌های سلولی همیشه وابسته به دوز نیست

به‌طوری‌که، در مطالعه آنها دوز ۱۰ میکروگرم از دوز ۳۰ میکروگرم اثرات بهتری را نشان داده بود. آنها بیان کردند این تاثیر می‌تواند ناشی از اشباع گیرنده‌های سطح سلول‌های سرطانی و عدم پاسخ آنها به این مهارکننده‌ها باشد. در مطالعه حاضر نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد، با وجود اینکه آزمایش real-time PCR نشان‌دهنده بیان بالای ژن کاسپازهای ۳ و ۹ در تمام دوزها بوده است. قابل ذکر است که بیان بالای ژن به معنای بیان بالای پروتئین نیست، به‌خصوص در سلول‌های سرطانی که مکانیسم‌های طبیعی متابولیسم و پروتئین‌سازی مسیرهای غیرمعمولی را پیش می‌گیرد. بنابراین، ممکن است ژن بیان بالایی داشته و یا حتی پروتئین‌سازی نیز صورت گرفته ولی به‌دلیل اشباع گیرنده های سطح سلولی القاء آپوپتوز در دوزهای بالاتر از ۲۵ میکروگرم صورت نگرفته باشد. در مطالعه سفیدابی و همکاران در سال ۲۰۱٦ نیز غیروابسته به دوز بودن اثرات عصاره بربرین (Berberine) بر رده سلولی CF41.MG نیز به اثبات رسید که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد (Sefidabi *et al*., 2016).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط پان و همکاران انجام گردید، نشان داده شد امتین (emetine) اتصالات تناوبی کاسپاز ۹ را در سلول‌های توموری تنظیم می‌کند. اگزون‌های ۳ تا ٦ در کاسپاز ۹ اتصالات تناوبی پیدا می‌کنند که این اتفاق سبب بزرگ‌تر شدن کاسپاز ۹ و همچنین القاء روند آپوپتوز می‌شود. در مقابل، هرچه کاسپاز ۹ کوچک‌تر باشد خواص ضد آپوپتوزی پیدا می‌کند. الگوهای مختلف اتصالات ژن کاسپاز ۹ که با معرف‌های شیمی‌درمانی تنظیم شده‌اند، ممکن است حساسیت و یا مقاومت را در تومورها نسبت به سایر القاءکننده‌های مرگ سلولی ایجاد کنند. در تحقیق انجام‌شده بیان ژن کاسپاز ۹ نیز سبب ارتقاء روند آپوپتوز گردید (Pan *et al*., 2011). در مطالعه حاضر نیز بیان ژن کاسپاز ۹ به اثبات رسید.

کیم و همکاران در سال ۲۰۱۲، لیگنان (lignan) تشکیل‌دهنده زیرفون را از نظر فعالیت ضد توموری و ضد التهابی مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که متانولیک استخراج‌شده از تنه زیرفون به‌طور مشخصی دارای خاصیت سیتوتوکسیک علیه A549 (کارسینومای ریه)، Sic-Ov-3 (آسیت بدخیم تخمدان)، Sic-MEL-2 (ملانومای پوست) و HCT-IS (آدنوکارسینوی کولون) می‌باشد که نقش ضدسرطانی گیاه زیرفون در مطالعه حاضر نیز به اثبات رسید (Kim *et al*., 2012).

مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱٤ توسط جانکلانگ و همکاران روی فعالیت ضدتوموری گیاه زیرفون گونه کورینین (corinin) روی کلانژیوسلولار کارسینومای انسان در محیط آزمایشگاهی و در بدن موجود زنده انجام شد (Janeklang *et al*., 2014)، که نشان داده است زیرفون گونه کورینین از طریق افزایش فعالیت کاسپازها و افزایش BAX، کاهش Bclxl و القاء آپوپتوز به‌طور ویژه از پرولیفراسیون رده سلولی IC SO 4S- 7M کلانژیوسلولار کارسینوما ممانعت می‌کند و به‌طور چشم‌گیری رشد تومور در موش‌های مبتلا به کلانژیوسلولار کارسینوما را کاهش می‌دهد (Janeklang *et al*., 2014).

در سال ۲۰۱٦ سفیدابی و همکاران، بربرین (Berberine) را به عنوان یک آلکالوئید مهم و موثر از تیره زرشک (Berberiedaceae) استخراج کردند و به

خاصیت آنتی‌پرولیفراتیو و حتی القاء مرگ سلول‌های سرطانی مورد مطالعه یعنی کارسینومای غدد پستانی سگ رده CF41.Mg در محیط *in vitro* و هم چنین مطالعه حیوانی پی بردند (Sefidabi *et al*., 2016).

نتایج این مطالعه تاییدکننده اثر مهاری و ضد رشد عصاره گیاه زیرفون بر تکثیر رده سلولی CF41.MG می‌باشد. مطالعات تکمیلی جهت شناختن ترکیبات مختلف گیاه زیرفون و تاثیرات هر کدام از آنها بر میزان تکثیر سلول‌های سرطانی لازم است تا بهترین ترکیب و بهترین دوز مشخص گردد. لازم به ذکر است که رفتار سلول‌های سرطانی در محیط آزمایشگاه و درون بدن ممکن است تفاوتهایی را داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه پاتولوژی و کشت سلولی دانشکده تخصصی دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات تهران تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تضاد منافعی در این مطالعه وجود ندارد.

منابع

- Brizi, M.R., Marrassini, C., Zettler, G., Ferraro, G., Anesini, C. (2012). Comparative antiproliferative action of two extracts from Tilia x viridis on normal and tumoral lymphocytes: relationship with antioxidant activity. Chinese Medicine, 3: 20-29.
- Cassali, G.D., Lavalle, G.E., De Nardi, A.B., Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Estrela-Lima, A., *et al*. (2011). Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, 4(2): 153-180.
- Janeklang, S., Nakaew, A., Vaeteewoottacharn, K., Seubwai, W., Boonsiri, P., Kismali, G., *et al.* (2014). In vitro and in vivo antitumor activity of tiliacorinine in human cholangiocarcinoma. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15(17): 7473-7478.
- Kim, K.H., Moon, E., Kim, S.Y., Choi, S.U. and Lee, K.R. (2012). Lignan constituents of Tilia amurensis and their biological evaluation on antitumor and anti - inflammatory activities. Food and Chemical Toxicology, 50(10): 3680-3686.
- Marrassini, C., Anesini, C. and Ferraro, G. (2011): HPLC fingerprint of a flower extract of Tilia x viridis and correlation with antiproliferative and antioxidant activity. Phytotherapy Research, 25(10): 1466-1471.
- Pan, D., Boon-Unge, K., Govitrapong, P. and Zhou, J. (2011). Emetine regulates the alternative splicing of caspase 9 in tumor cells. Oncology Letters, 2(6):1309-1312.
- Pecorino, L. (2012). Molecular Biology of Cancer. 3rd ed., UK: Oxford University Press, pp: 10-11.
- Ruberte, J., Sautet, J.Y., Gine, J.M., Lopez, C. and Rodriguez, A. (1990). Topography of lymphatic drainage from mammary glands of the bitch. Anatomia, Histologia, Embryologia, 19(4): 358-347.
- Sefidabi, R., Mortazavi, P. and Hoseni, S. (2016). Antiproliferative effect of berberine on canine mammary gland cancer cell culture. Biomedical Report, 6(1): 95-98.

- Slatter, D. (2003). Text Book of Small Animal Surgery.3rd ed., Elsevier Science, pp: 349-350.
- Yayalai, Y., Celik, I. and Bati B. (2014). Hepatoprotective and antioxidant activity of Linden (Tilia platyphyllos L.) infusion against ethanol-induced oxidative stress in rats. The Journal of Membrane Biology, 247(2): 181-188.
- Zargari, A. (1989). Medicinal Plants. 7th ed., Iran: Tehran University Press, pp: 399. [In Persian]