

بررسی اثرات همزمان پلی فنل سیننتین و پرتوهای یونیزان بر سلول‌های سرطان سینه انسانی MDA-MB-231

خلاصه

مقدمه: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها میان زنان و بعد از سرطان ریه دومین علت مرگ در زنان می‌باشد. از مهم‌ترین کاربردهای پرتوها می‌توان به پرتودرمانی سلول‌های سرطانی اشاره کرد. بیمارانی که تحت اشعه قرار دارند، ممکن است با عود سرطان روبه‌رو شوند. استفاده از درمان‌های ترکیبی پلی‌فنل‌های گیاهی (سیننستین) به همراه پرتودرمانی به علت استفاده از دوزهای درمانی کمتر، سبب کاهش سمیت سیستمیک درمان‌های رایج سرطان می‌شود.

روش بررسی: برای ارزیابی مدت‌زمان دو برابر شدن و به‌دست آوردن مدت‌زمان تیمار سلول‌ها منحنی رشد رسم گردید. با بهره‌گیری از تست MTT، اثر سمیت داروی سیننستین بر روی رشد این رده سلولی مشخص گردید. به‌منظور بررسی مرگ تولیدمثلی سلول‌های سرطانی، قبل از تیمار با پلی‌فنل، بعد از استفاده از پرتوهای یونیزان و بعد از استفاده از درمان ترکیبی از تست کلونی‌زایی استفاده شد.

یافته‌ها: مدت‌زمان دو برابر شدن رده سلولی MDA-B-231، ۲۴/۳۹ ساعت است. داروی سیننستین به‌تنهایی یک داروی مؤثر برای درمان رده سلولی MDA-B-231 بوده است و با افزایش غلظت دارو میزان آسیب به بافت‌های سرطانی بیشتر شده است. مناسب‌ترین زمان برای درمان سلول‌های آسیب‌دیده ۴۸ ساعت می‌باشد و غلظت کشندگی این دارو ۰/۱ میکرومولار است. درمان ترکیبی پرتو و پلی‌فنل سیننستین باعث کاهش راندمان کشت شده است.

نتیجه‌گیری: این دارو در حضور پرتو خاصیت حساسیت پرتویی داشته است. در صورتی که حساس‌کننده پرتویی به مواد شیمیایی همزمان استفاده شوند، اثرات کشنده پرتوها را افزایش می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: پرتودرمانی، درمان ترکیبی، پلی‌فنل سیننستین، سرطان سینه، رده سلولی MDA-B-231

نکیسا رضاخانی^۱

بهرام گلیایی^۲

محمد کاظم پریور^۳

علیرضا نیکوفر^۴

۱. گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲. استاد گروه بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. استاد گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۴. استادیار گروه رادیوتراپی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

نویسنده‌مسئول: بهرام گلیایی | تلفن: ۰۲۱۶۶۱۱۱۳۳۵۶
پست الکترونیک: goliaei@ut.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان پنجمین علت اصلی مرگ و میر در زنان ایرانی است [۱]. مشاهدات حاکی از آن است که بروز انواع سرطان‌ها تا سال ۲۰۳۰ بیشتر می‌شود [۲]. رده سلولی MDA-MB-231 نماینده گروهی از سلول‌های سرطان سینه با ویژگی Estrogen Receptor Negative Breast Cancer که فاقد گیرنده‌های استروژنی آلفا و بتا و فاقد گیرنده پروژسترونی می‌باشد و این سلول‌ها جزء سلول‌های Triple-negative طبقه‌بندی می‌شوند [۳]. رادیوبیولوژی به معنای مطالعه اثرات پرتوهای یونیزان بر موجودات زنده می‌باشد. از مهم‌ترین کاربردهای پرتوها می‌توان به پرتودرمانی سلول‌های سرطانی اشاره کرد [۴].

در سلول مجموعه‌ای از آبشارهای سیگنالی وجود دارد که در اثر پاسخ به پرتوها افزایش می‌یابد. زمانی که اشعه یونیزان (ایکس و گاما) به بافت زنده داده شود، بسیاری از اتم‌ها واکنش انجام می‌دهند و در نتیجه مولکول‌ها و یا یون‌هایی با الکترون‌های جفت‌نشده تولید می‌کند. این مواد بسیار واکنش‌پذیر می‌باشند و رادیکال‌های آزاد آن می‌تواند همراه با پروتئین‌های غشای سلولی برای تحریک سیگنالینگ به کار برده شوند [۵]. رادیکال‌های آزاد در مرگ سلولی باعث القای آپوپتوز می‌گردد. آسیب ناشی از استرس ممکن است در مرگ سلولی مؤثر باشد و یا ممکن است باعث تغییر سیگنال‌های متوالی و در نتیجه فعال شدن ژن القای آپوپتوز باشد. از آنجاکه سلول‌های سرطانی نسبت به آپوپتوز مقاوم هستند، با تابش پرتو و استرس اکسیداتیو می‌توان تا حدود زیادی به آن‌ها آسیب وارد نمود [۶].

با این حال، سلول‌های سرطانی که توانسته‌اند از اثر مرگبار پرتو جان سالم به‌در ببرند، معمولاً خصوصیات تهاجمی بیشتری پیدا می‌کنند، سریع تکثیر می‌شوند و توانایی مهاجرت و گزایی بیشتری نیز به‌دست می‌آورند [۷].

به‌طور کلی تومورهای حساس به پرتو تومورهایی هستند که به دوزهای نه‌چندان زیاد پرتوهای یونیزان پاسخ نسبتاً سریعی می‌دهند. در مقابل تومورهای مقاوم به پرتو، تومورهای هستند که حتی به بالاترین دوزهایی که برای بدن قابل تحمل است نیز پاسخ قابل توجهی نمی‌دهند [۸]. در حقیقت هدف از پرتودرمانی سرطان این است که با حداقل آسیب به بافت‌های سالم، بیشترین آسیب به سلول‌های سرطانی وارد شود، به‌عنوان مثال از حساس‌کننده‌های پرتویی و یا محافظت‌کننده‌های پرتویی، پرتوهایی با انتقال خطی انرژی بالا و پایین در تقسیم‌بندی دوز استفاده می‌شود [۹ و ۱۰]. حساس‌کننده‌های پرتویی ترکیباتی هستند که باعث افزایش تأثیر زیست‌شناختی پرتو یونساز می‌شوند و آثار کشنده تشعشع را در صورت تجویز همراه با آن افزایش می‌دهند [۱۱].

محدودیت اصلی در استفاده از مواد شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی ایجاد اثرات جانبی در بافت‌های سالم مجاور تومور است. استفاده همزمان مواد حساس‌کننده پرتویی به مواد شیمیایی، اثرات کشنده پرتوها را افزایش

می‌دهند. ترکیبات گیاهی (پلی-فنل‌ها) به واسطه مهار مسیرهای مقاومت پرتویی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی ممکن است منجر به حساس کردن پرتوهای یونیزان شوند. پلی‌فنل‌ها همچنین باعث محافظت بافت سالم در کنار تومورها می‌شوند. استفاده از درمان ترکیبی به واسطه پلی‌فنل‌های گیاهی همراه با پرتودرمانی منجر به استفاده دوزهای پرتویی کمتر می‌شود و به دنبال آن باعث کاهش سمیت سیستمیک می‌شود [۱۴-۱۲]. یکی از اعضای خانواده پلی‌فنل‌ها سیننستین است. سیننستین از برگ‌های گیاه *Orthosiphon stamineus* (گیاه سبیل گربه) به‌دست می‌آید و همچنین بر روی پوست مرکبات نیز مشاهده شده‌است. این ترکیب از خانواده پلی‌متیلید فلافونوئید و نوعی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. پلی‌متیلید فلافونوئیدها پتانسیل شیمی‌درمانی دارند [۱۵ و ۱۶].

این مطالعه به منظور ارزیابی اثر حساس‌کنندگی پرتویی پلی‌فنل سیننستین بر روی رده سلولی سرطان سینه انسانی MDA-MB-231 انجام گرفت. استفاده از درمان ترکیبی پلی‌فنل سیننستین و پرتوی یونیزان در درمان سرطان سینه هنوز نامشخص بود. به همین علت بر آن شدیم تا با طرح این مطلب از درمانی ترکیبی برای درمان رده سلولی MDA-MB-231 استفاده کنیم.

این طرح در سه گروه جای گرفت: درمان سلول‌های سرطان سینه انسانی MDA-MB-231 با استفاده از پرتوی یونیزان، درمان سلول‌های MDA-MB-231 با کمک پلی‌فنل سیننستین و در نهایت درمان همزمان این دو گروه.

روش بررسی

در این قسمت از رده سلولی سرطان سینه انسان MDA-MB-231 با ویژگی گیرنده استروژن منفی و قدرت تهاجمی و از بانک ملی سلول ایران (مؤسسه پاستور، ایران) خریداری شد.

سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco)، استرپتومایسین ۲۰۰ µg/ml و پنی‌سیلین ۵۰۰ units/ml (Gibco) کشت داده شد. در نهایت در داخل انکوباتور (رطوبت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO₂) قرار گرفتند. پس از آنکه میزان تراکم سلولی در هر پاساژ حدود ۸۰ درصد کف فلاسک می‌رسید و یا در صورت تغییر pH محیط کشت، سلول‌ها Trypsin/EDTA ۰/۲۵ درصد در بافر فسفات نمکی (PBS) پاساژ داده می‌شدند.

منحنی رشد یک مدل تجربی برای نشان دادن میزان رشد در طول زمان است. سرعت رشد سلول‌ها با توجه به شرایط محیط کشت مورد استفاده، سن سلول‌ها، تراکم و تعداد آن‌ها متفاوت است، بنابراین رسم منحنی رشد سلولی، محاسبه مدت زمان دو برابر شدن سلول‌ها و

(ب) آزمون کلونی‌زایی رده سلولی MDA-MB-231 در مواجهه با پرتوهای یونیزان (اشعه ایکس)

(ج) آزمون کلونی‌زایی رده سلولی MDA-MB-231 در هنگام درمان با پلی‌فنل سیننستین

(د) آزمون کلونی‌زایی رده سلولی MDA-MB-231 به منظور ارزیابی درمان ترکیبی (سیننستین و پرتوی یونیزان)

(الف) به منظور یافتن تعداد مناسب سلول برای به دست آوردن ۴۰ تا ۷۰ کلونی در پتری‌های ۳۵ ملی‌متر تعداد ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ سلول سرطان سینه انسانی MDA-MB-231 کشت داده شد. بعد از گذشت از ۷ روز کلونی‌ها مشاهده شدند. برای مشاهده کلونی‌ها در زیر میکروسکوپ نوری در مرحله اول کلونی‌ها توسط محلول فرمالدئید ۲ درصد (Merck) به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با کریستال ویوله (Merck) رنگ آمیزی شدند.

راندمان کشت سلول‌ها از طریق رابطه زیر محاسبه شد (رابطه ۲).

رابطه ۲

(٪ راندمان کشت) = $100 \times$ تعداد سلول‌های کشت داده شده / تعداد کلونی‌های شمارش شده

(ب) به منظور پرتودهی رده سلولی MDA-MB-231 با تراکم $10,000 \text{ cell/cm}^2$ در پلیت‌های ۲۴ چاهکی کشت داده شد. قبل از پرتودهی سلول‌ها با محیط کشت تازه حاوی ۱۰ درصد سرم تعویض شدند. دوزهای پرتویی ۲ و ۴ و ۶ و ۸ و ۱۰ گری بودند و این امر توسط دستگاه اشعه ایکس (مدل Primus) ساخت شرکت زیمنس (جدول شماره ۱) صورت گرفت و بعد از پرتودهی، سلول‌های تریپسینه شمارش شدند. بعد از گذشت مدت زمان لازم برای تشکیل کلونی، آن‌ها توسط فرمالدهید و کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند. در نهایت راندمان کشت سلولی از رابطه ۲ محاسبه شد و برای به دست آوردن کسر بقاء از رابطه ۳ استفاده گردید.

رابطه ۳

کسر بقا = راندمان کشت نمونه تیمار شده / راندمان کشت نمونه شاهد

جدول ۱: مشخصات دستگاه اشعه ایکس مورد استفاده در پرتودهی

Mode	X-Ray
Energy(Me V)	6
Accelerator	Magnetron
Dose Rate	200 (cGy/min)
SAD	100cm
Field Size	36cm × 36cm

شناسایی خصوصیات رشد یک رده سلولی در استانداردسازی مطالعات سلولی بسیار ارزشمند است.

رسم منحنی رشد سلولی

به منظور تهیه منحنی رشد رده سلولی MDA-MB-231 با تراکم $10,000 \text{ cell/cm}^2$ در هر چاهک پلیت‌های ۲۴ چاهکی افزوده شد. هر روز سلول‌های کف و رویی سه چاهک جمع‌آوری شد و تعداد سلول‌های زنده شمارش گردید. این شمارش سلولی تا ۷ روز انجام شد و هر سه روز یک بار نیمی از محیط کشت هر چاهک خارج و محیط کشت جدید حاوی ۱۰ درصد سرم به درون هر چاهک افزوده شد. این آزمایش از سه نمونه مستقل با سه بار تکرار در هر روز انجام شد.

محاسبه زمان دو برابر شدن سلول‌ها

به منظور بررسی مدت زمان دو برابر شدن سلول‌ها از فرمول پترسون استفاده گردید:

$$Td = T \times \log 2 / \log \left(\frac{N_2}{N_1} \right)$$

در این فرمول Td زمان دو برابر شدن سلول‌ها است و N_1 تعداد سلول‌ها در روز اول مرحله نمایی رشد و N_2 تعداد سلول‌ها بعد از پایان مرحله نمایی رشد است. T (ساعت) از تقسیم دو پارامتر N_2 به N_1 است.

آزمون MTT

رده سلولی MDA-MB-231 با تراکم $10,000 \text{ cell/cm}^2$ در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شد و برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت سلول‌ها تحت تیمار سیننستین (Caymanchem, USA) با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰ میکرومولار قرار گرفته‌اند. بعد از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک (MTT Sigma USA) با غلظت نهایی ۰/۰۵ mg/ml در محیط کشت در هر چاهک افزوده شد. پس از گذشت سه ساعت از زمان انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO (Merck Germany) به هر چاهک اضافه شد و جذب محلول هر چاهک توسط دستگاه الیزایدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر (مربوط به جذب رنگ MTT) و ۶۳۰ نانومتر (مربوط به جذب زمینه) سنجیده شد. بین میزان جذب (شدت رنگ) با تعداد سلول‌های زنده یک رابطه مستقیم وجود دارد و به صورت زیر محاسبه می‌شود:

رابطه ۱

درصد بقاء سلول‌های تیمار شده = (میانگین جذب سلول‌های تیمار شده) / (میانگین جذب سلول‌های شاهد) $\times 100$

آزمون کلونی‌زایی (Colony assay)

این آزمون در ۳ مرحله انجام گرفت:

(الف) آزمون کلونی‌زایی رده سلولی MDA-MB-231

رسم منحنی رشد رده سلولی MDA-MB-231 و تعیین زمان دوبرابر شدن سلول‌ها

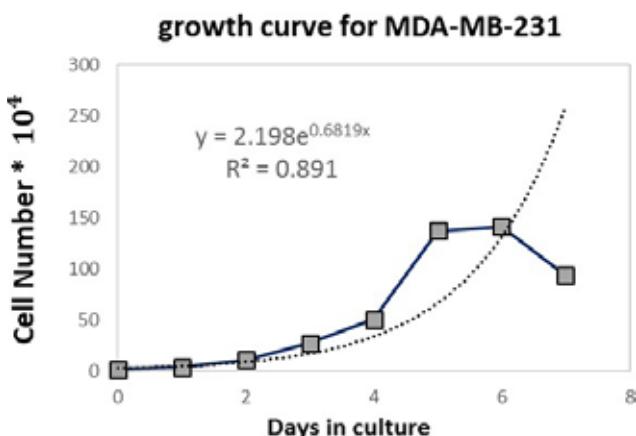
ترسیم منحنی رشد و تعیین زمان دو برابر شدن رده سلولی علاوه بر ارائه اطلاعات از مقایسه سرعت رشد و تقسیم آن‌ها جهت تخمین تعداد سلول‌ها در زمان‌های کشت و فواصل پاساژها کاربرد اساسی دارد. پس از شمارش و رسم منحنی رشد در مقیاس نیمه لگاریتمی، سه فاز رشد تأخیری، رشد لگاریتمی و رشد ثابت مشخص شده است. به منظور محاسبه زمان دوبرابر شدن رشد سلولی، ابتدا فاز لگاریتمی رشد سلولی که معادل بیشترین شیب در منحنی رشد (خط نقطه چین) تعیین شد. سپس خطی مستقیم در مقیاس لگاریتمی بر آن برازش داده شد. براساس معادله نمایی خط برازش شده، مدت زمان دو برابر شدن برحسب روز محاسبه شد. در نمودار زیر منحنی رشد رده سلولی MDA-MB-231 از مجموع سه آزمایش مستقل نمایش داده شده است. بر این اساس، متوسط زمان دو برابر شدن از مجموعه سه آزمایش مستقل ۲۴/۳۹ ساعت به دست آمد (نمودار ۱).

بررسی تأثیر سیننستین بر تکثیر سلول‌های MDA-MB-231

در این مطالعه به منظور تعیین اثر پلی فنل سیننستین بر تکثیر سلولی و توانایی زنده ماندن سلول‌ها (Cell Viability) از آزمون رنگ سنجی MTT استفاده شد. در منحنی شماره ۲ تیمار رده MDA-MB-231 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داده شده است.

لازم به ذکر است که غلظت مهار ۵۰ درصدی The Half Maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀)

در زمان‌های گفته شده در جدول ۱ براساس معادله نمایی خط برازش شده و گزارش گردید. براساس آنالیز آماری انجام شده اختلاف بین درصد بقاء سلول‌ها در گروه نمونه کنترل بر نمونه کنترل حلال



نمودار ۱: رسم منحنی رشد سلولی MDA-MB-231 از مجموع سه آزمایش مستقل در مقیاس نیمه لگاریتمی. فاز لگاریتمی در روزهای ۲ تا ۵ داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) نشان داده شده است.

(ج) این مطالعه به منظور تعیین اثر سیننستین بر روی توانایی کلونی‌زایی سلول‌های MDA-MB-231 انجام گرفت. سلول‌های کشت داده شده تحت تیمار سیننستین با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار قرار گرفته‌اند. پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت، تعداد ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ سلول در پتری‌های ۳۵ میلی متری برای ایجاد کلونی کشت داده شدند.

بعد از گذشت از ۷ روز راندمان کشت رده سلولی MDA-MB-231 محاسبه شد.

(د) در این مرحله از آزمایش، قدرت کلونی‌زایی سلول‌ها در حضور پلی فنل سیننستین و پرتو به صورت همزمان مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار سیننستین با غلظت‌های ۰/۱ میکرومولار قرار گرفته‌اند. محیط کشت سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت تیمار با سیننستین، با محیط کشت تازه حاوی ۱۰ درصد سرم تعویض شد. سپس سلول‌ها تحت تابش ۸،۶،۴،۲ و ۱۰ گری پرتو قرار گرفتند. بعد از گذشت مدت زمان لازم برای تشکیل کلونی (۷ روز)، راندمان کشت سلولی آن‌ها محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی متغیرها از نرم افزارهای Excel و MATLAB و SPSS نسخه ۱۷ و از روش T-Test استفاده گردید و برای بررسی سنجش معنی داری از روش ANOVA استفاده شد.

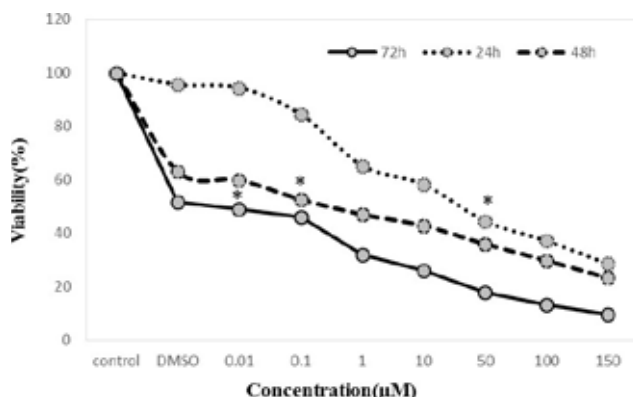
یافته‌ها

مورفولوژی رده‌های سلولی MDA-MB-231

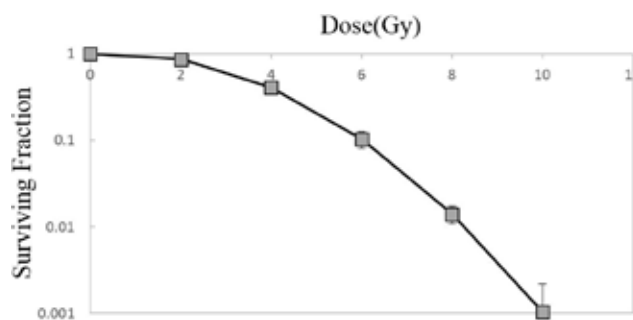
در این قسمت شکل ظاهری رده سلولی MDA-MB-231 توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). از نظر شکل ظاهری این گروه به صورت دوکی شکل می‌باشند و کاملاً کشیده هستند. این رده سلولی جزء رده سلولی فاقد گیرنده پروژسترونی و استروژنی هستند.



شکل ۱: شکل ظاهری رده سلولی MDA-MB-231 در مدل کشت تک لایه را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۲۲۰×)



نمودار ۲: تعداد سلول‌های زنده رده سلولی MDA-MB-231 تیمار شده با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار از سینستین پس از الف (۲۴)، ب (۴۸)، ج (۷۲) ساعت تیمار، از طریق نمودار خطی گزارش شده است. نتایج حاصل سه بار تکرار بوده است، داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین SEM نمایش داده شده است نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشد



نمودار ۳: منحنی بقاء رده سلولی MDA-MB-231 برحسب دوزهای مختلف پرتوی یونیزان ایکس (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ گری) است. نمودار حاصل نتایج این سه بار تکرار است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) نشان داده شده است.

بررسی تأثیر سینستین بر روی ویژگی حساسیت پرتویی سلول‌های MDA-MB-231

به منظور بررسی تیمار همزمان سینستین و پرتو از آزمون کلونی‌زایی برای تعیین بقاء کلونوزئیک سلول‌ها استفاده شد. سلول‌ها بعد از تیمار با سینستین تحت تابش پرتوی یونیزان اشعه ایکس با دوزهای مختلف قرار گرفتند. پس از محاسبه کسر بقاء منحنی دوز-پاسخ رسم گردید سپس با استفاده از نرم‌افزار مطلب که این داده‌ها بر مدل خطی درجه دو منطبق شد و پارامترهای α و β تعیین گردید. نتایج این تست بیان می‌کند که توانایی کلونی‌زایی سلول‌ها را در مقابل پرتو و در حضور داروی سینستین اثر کاهشی داشته است (نمودار ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

از مهم‌ترین مشکلات ایجاد شده در پرتودرمانی سرطان‌ها می‌توان به مقاومت ذاتی یا اکتسابی تومور به پرتوها و همچنین به پاسخ ضعیف یا حتی عدم پاسخ سلول‌های سرطانی به پرتودرمانی و سمیت غیراختصاصی نسبت به سلول‌های بافت نرمال اشاره کرد. مقاومت ذاتی به دلیل حضور

DMSO در این رده سلولی به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. براساس نمودار شماره ۲ کاهش معنی‌داری بین تعداد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل از غلظت ۵۰ میکرومولار برای سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 بعد از تیمار ۲۴ ساعت سینستین یافت شد، اما بعد از تیمار ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری بین تعداد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل برای سلول‌های MDA-MB-231 ۰/۱ میکرومولار بوده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تغییرات معنی‌داری بر روی تکثیر سلول‌ها در غلظت ۰/۰۱ در زمان ۷۲ ساعت بوده است. به‌طور کلی تیمار با سینستین باعث کاهش سرعت رشد شده و سمیت سلولی را افزایش داده است (نمودار شماره ۲). جهت بررسی درمان ترکیبی نباید دارو سمیت زیادی داشته باشد و زمان مناسبی برای تیمار آن باید مطابق شرایط طبیعی بدن و قدرت دفع آن‌ها از بدن باشد، براین اساس غلظت ۰/۱ میکرومولار و زمان ۴۸ ساعت انتخاب گردید.

جدول ۲: غلظت مهاری ۵۰ درصدی یا IC_{50} سینستین برای سلول‌های MDA-MB-231 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

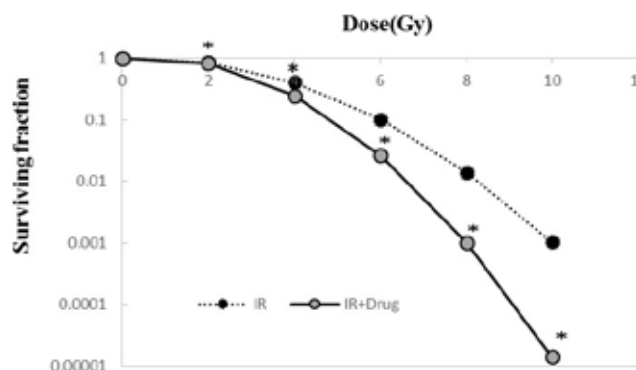
زمان انکوباسیون سینستین (ساعت)	IC_{50} برای رده سلولی MDA-MB-231 (میکرومولار)
۲۴	۵۰
۴۸	۰/۱
۷۲	۰/۰۱

بررسی تأثیر توان کلونوزئیک سلول‌های MDA-MB-231 در مواجهه با پرتو یونیزان (اشعه ایکس)

به منظور بررسی پاسخ سلول‌ها نسبت به پرتو از این روش استفاده شد. آزمون کلونی‌زایی بلافاصله بعد از پرتودهی سلول‌ها انجام شد. در نمودار ۳ منحنی‌های بقاء رده سلولی MDA-MB-231 برحسب دوزهای مختلف پرتوی ایکس نشان داده شده است. کسر بقاء در دوزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ گری اشعه ایکس روند کاهشی داشته است و این موضوع نشان می‌دهد که افزایش میزان آسیب با افزایش دوز پرتو رابطه مستقیم دارد. در دوز صفر (دوز پس‌زمینه محیط)، منحنی‌های بقاء عدد یک را نشان می‌دهد و به این معناست که در این دوز افزایش و یا کاهشی در سطح بقاء سلولی رخ نداده است (نمودار ۳).

سنجش توانایی کلونی‌زایی سلول‌های MDA-MB-231 در حضور پلی‌فنل سینستین

بعد از انجام آزمون MTT و تعیین میزان کشندگی ماده، توانایی کلونی‌زایی سلول‌های MDA-MB-231 بررسی شد. این نمودار نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سینستین تعداد کلونی‌های کمتری تشکیل شده است (نمودار ۴).



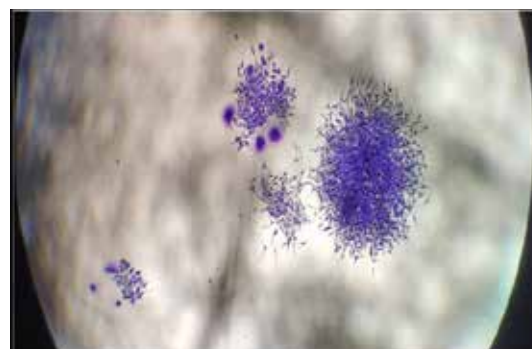
نمودار ۵: منحنی‌های بقاء رده سلولی MDA-MB-231 بر حسب دوزهای مختلف پرتوی یونیزان و تیمار ترکیبی سیننتین و پرتوی یونیزان ایکس. اختلاف بین منحنی‌های بقاء گروه کنترل و کنترل حلال DMSO به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. نتایج نشان‌دهنده سه بار تکرار است و نمودار د حاصل نتایج این سه بار تکرار است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) نشان داده شده است. نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری $P < 0.05$ میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل مربوطه می‌باشد.

بسیار مؤثر در بهبود پدیده پرتودرمانی محسوب می‌شود زیرا آسیب‌های ناخواسته به بافت‌های نرمال مجاور در هنگام پرتودرمانی موجب ایجاد محدودیت‌ها در به‌کارگیری دوز درمانی مؤثر، تکمیل دوره درمان و به‌طور کلی منجر به شکست طرح درمان می‌گردد. متأسفانه، کاهش دوز درمانی مؤثر باعث عدم ریشه‌کشی کامل تومور و عود مجدد سرطان می‌شود. درمان سلول‌های سرطانی به‌معنای تخریب کامل سلول‌های سرطانی و عدم عود مجدد، به افزایش سمیت در سلول‌های سرطانی و کاهش اثرات مخرب جانبی در بافت‌های نرمال مجاور در یک زمان بستگی دارد. مقاومت پرتویی سلول‌های سرطانی نسبت به پرتودرمانی و ایجاد سلول‌های مقاوم به پرتو یکی از مهم‌ترین مشکلات پرتودرمانی می‌باشد [۱۷].

تعداد زیادی از ترکیبات طبیعی همراه با تابش پرتوها باعث کاهش اثرات سیتوتوکسیکی سلول‌های سرطانی می‌شوند. یکی از مکانیزم‌های پیشنهادی برای درمان سرطان، استفاده از حساس‌کننده‌های پرتویی است. این گروه به همگام‌سازی چرخه سلولی کمک می‌کند. پرتودرمانی پس از عمل جراحی می‌تواند در کنترل تومور مؤثر باشد. موفقیت در پرتودرمانی وابسته به افزایش حساسیت سلول‌های بدخیم ناشی از تشعشع است. تعدیل‌کننده‌های غذایی و مواد موجود در گیاهان می‌توانند همراه با پرتوها در درمان سرطان استفاده شوند. مواد گیاهی باعث افزایش اثر اکسیداتیو و یا هماهنگ‌سازی سلول‌ها در مرحله حساس چرخه سلولی باعث افزایش سرعت کشته شدن تومورها می‌شوند [۱۸]. کاهش بقاء کلونوزنیک در

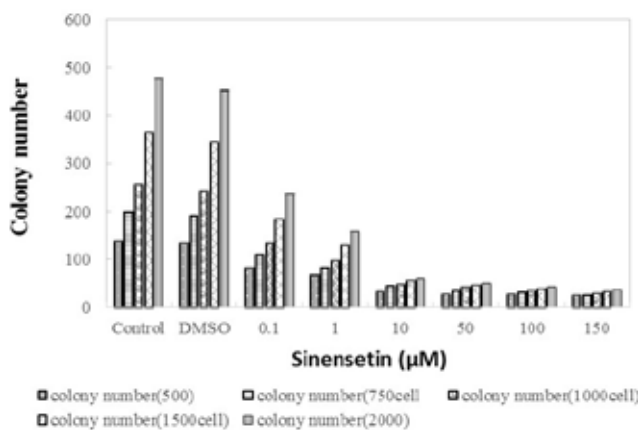
جدول ۳: پارامترهای آلفا و بتا مربوط به منحنی بقاء سلول‌های MDA-MB-231 را بیان می‌کند.

نوع تیمار	α	β
پرتو دهی	۰/۰۷۹۷۲	۰/۰۷۶۵۹
پرتو دهی + سیننتین	۰/۱۶۴۴	۰/۱۲۸۱



شکل ۲: نمای تصاویر تهیه‌شده از آزمون کلونی‌زایی به منظور تعیین حساسیت پرتویی تهیه‌شده. در این عکس رنگ آمیزی با کریستال ویوله انجام شده است. شکل‌های الف و ب) معرف سلول‌های MDA-MB-231 قبل و بعد از پرتو است (بزرگنمایی $\times 400$)

پروتئین‌های مسیرهای بقاء رشد و ترمیم سلولی و ضدآپوپتوزی که به‌طور طبیعی در سلول‌های سرطانی افزایش بیان دارند و مقاومت اکتسابی به‌دلیل القاء بیان این پروتئین‌ها در طی فرآیند پرتو دهی ایجاد می‌شود. در صورتی‌که پرتودرمانی باعث افزایش شدت آسیب و عدم ایجاد مقاومت پرتویی در بافت‌های توموری و بافت‌های سالم بدن شود، این امر گامی



نمودار ۴: تعداد کلونی‌های به‌دست آمده از سلول‌های MDA-MB-231 بر حسب غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار سیننتین بعد از ۴۸ ساعت تیمار در تعداد ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ سلول. نتایج حاصل سه بار تکرار است که در هر تکرار سه نمونه مشابه وجود داشته است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) نشان داده شده است. در تمام غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) مشاهده می‌شود.

از محققان در سال ۲۰۱۸ از پلی-فنل نوبیلیتین برای مهار سلول‌های سرطان استفاده کردند. این پلی‌فنل یکی از اعضای گروه فلانون است و می‌تواند القای آپوپتوز را با افزایش ژن STAT3 انجام دهد [۲۶]. طبق پژوهش‌های گذشته و تحقیقات پیش رو مشخص گردید که این پوست مرکبات و گیاه سبیل گربه منبع پلی‌فنل گیاهی می‌باشد و باعث می‌شود که سلول‌های توموری سریع‌تر به پرتو پاسخ دهند در نتیجه با استفاده از ترکیب همزمان سیننستین و پرتودرمانی میزان دوز وارد شده به سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد.

حضور پرتوی یونیزان تحت‌تأثیر انواع مرگ سلولی رخ می‌دهد، در نتیجه اجتماعات کوچک سلولی تشکیل شده و بررسی از سلول‌های کشت داده شده تقسیم نمی‌شوند و یا به‌صورت تکی باقی می‌مانند [۱۹]. سیننستین دارای اثرات مهار در رشد و تکثیر سلولی و کاهش بقا و افزایش سمیت سلولی در یک الگو وابسته به زمان و غلظت است. در مطالعات دیگر در این زمینه نشان داده شد که این ماده باعث مهار رشد در سلول‌های سرطان معده شده است [۲۰]. علاوه بر این اثرات ضدسرطانی و مهار رشد پلی‌فنل سیننستین بر روی سلول‌های MCF7 و کلون اثبات شده است [۲۱]. از سوی دیگر، با افزایش مدت‌زمان تیمار، غلظتی از سیننستین که ۵۰ درصد کشندگی ایجاد می‌کند، کاهش می‌یابد و این امر اثبات می‌کند که اثرات سیننستین علاوه بر غلظت، به مدت‌زمان تیمار نیز بستگی دارد. در سال ۲۰۱۴ نیز مشخص شد که پلی‌فنل گاسیپول^۱ توانایی کاهش راندمان کشت در رده سلولی گلیوبلاستوما^۲ در یک الگو وابسته به غلظت و زمان داشته است [۲۲]. به‌منظور بررسی اثر حساس‌کنندگی پرتویی ترکیب با سیننستین و تفسیر نمودارهای حاصله از منحنی درجه دو استفاده می‌شد. این مدل در سال ۱۹۸۹ مطرح گردید و اولین پارامتر جزء خطی معادله با شیب اولیه منحنی بیان می‌شود و دومین پارامتر جزء درجه دو انحنا آن را در دوزهای بالا توصیف می‌کند. براساس فرض این مدل مرگ سلولی ناشی از ایجاد یک آسیب کشنده یا اندرکنش چندین آسیب غیر کشنده می‌باشد. در دوزهای کم دو شکست ایجاد شده در ساختار DNA از برخورد یک الکترون ناشی از جذب اشعه ایکس حاصل می‌شود در این حالت انتقال رخداد یک اندرکنش متناسب با دوز است و منحنی به‌صورت خطی است. در دوزهای بالاتر دو شکست ناشی از برخورد دو الکترون می‌باشد و منحنی خمیده می‌شود. پارامترهای α و β سهم هر جزء در منطقه دوزهای پایین و بالا را به‌صورت جداگانه توصیف می‌کند [۲۳]. در حالتی که سلول‌ها با دارو تیمار شده و سپس تحت تابش پرتو قرار گرفته‌اند، نسبت به حالتی که فقط پرتو دمی صورت گرفته پارامتر β افزایش پیدا کرده و بنابراین مرگ سلولی بیشتر ناشی از اندرکنش‌های آسیب غیر کشنده و عدم ترمیم آن بوده است. بر این اساس می‌توان گفت که اثرات حساس‌کنندگی ماده ناشی از افزایش میزان آسیب‌ها در دوزهای بالا است. در مطالعه‌ای اثر حساس‌کنندگی پرتویی پلی‌فنل کافئیک‌اسید بر روی سرطان سینه نشان می‌دهد که در درمان‌های ترکیبی با دوز مشخص از ماده و مدت‌زمان تیمار کوتاه‌تر در کسر بقا سلول‌های پرتودیده و تیمار شده با دارو در مقایسه با سلول‌های پرتودیده مشاهده می‌شود [۲۴]. دلایل ژنتیکی این امر هنوز به‌صورت کامل مشخص نیست اما به‌علت ساختار شیمیایی این احتمال وجود دارد که سیننستین همانند هم‌خانواده خود نارنجین کاهش فعال‌سازی مسیر NF κ B / COX 2 caspase-1 باعث ایجاد آپوپتوز شود [۲۵]. برخی

1. Gossypol

2. Glioplastoma

References:

1. Akbari ME, Sayad S, Sayad S, Khayamzadeh M, Shojaei L, Shormaji Z, Amiri M. Breast cancer status in Iran: Statistical analysis of 3212 cases between 1998 and 2014. *International journal of breast cancer*. 2017.
2. Sadjadi A, Marjani H, Semnani S, Nasseri-Moghaddam S. Esophageal cancer in Iran: A review. *Middle East Journal of Cancer*. 2012; 1(1): 3-14.
3. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*. 2011; 13(4): 215.
4. Chen HH, Kuo MT. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*. 2017; 8(37): 62742.
5. Girdhani S, Bhosle SM, Thulsidas SA, Kumar A, Mishra KP. Potential of radiosensitizing agents in cancer chemo-radiotherapy. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2005; 1(3): 129.
6. Sainz RM, Lombo F, Mayo JC. Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers*. 2012; 4(2): 442-74.
7. Kiefer J. Biological radiation effects. Springer Science & Business Media; 2012.
8. Malik A, Sultana M, Qazi A, Qazi MH, Parveen G, Waquar S, Ashraf AB, Rasool M. Role of natural radiosensitizers and cancer cell radioresistance: an update. *Analytical Cellular Pathology*. 2016
9. Hirota Y, Masunaga SI, Kondo N, Kawabata S, Hirakawa H, Yajima H, Fujimori A, Ono K, Kuroiwa T, Miyatake SI. High linear-energy-transfer radiation can overcome radioresistance of glioma stem-like cells to low linear-energy-transfer radiation. *Journal of radiation research*. 2013; 55(1): 75-83.
10. Kuruba V, Gollapalli P. Natural radioprotectors and their impact on cancer drug discovery. *Radiation oncology journal*. 2018; 36(4): 265.
11. Tang L, Wei F, Wu Y, He Y, Shi L, Xiong F, Gong Z, Guo C, Li X, Deng H, Cao K. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018; 37(1): 87.
12. Poggi MM, Coleman CN, Mitchell JB. Sensitizers and protectors of radiation and chemotherapy. *Current problems in cancer*. 2001; 25(6): 334-411.
13. Verheij M, Vens C, van Triest B. Novel therapeutics in combination with radiotherapy to improve cancer treatment: rationale, mechanisms of action and clinical perspective. *Drug Resistance Updates*. 2010; 13(1-2): 29-43.
14. Harada H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy?. *Journal of radiation research*. 2011; 52(5): 545-6.
15. Hossain MA, Ismail Z. Quantification and enrichment of sinensetin in the leaves of *Orthosiphon stamineus*. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016; 9: S1338-41.
16. Stuetz W, Prapamontol T, Hongsibsong S, Biesalski HK. Polymethoxylated flavones, flavanone glycosides, carotenoids, and antioxidants in different cultivation types of tangerines (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) from Northern Thailand. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010; 58(10): 6069-74.
17. Girdhani S, Bhosle SM, Thulsidas SA, Kumar A, Mishra KP. Potential of radiosensitizing agents in cancer chemo-radiotherapy. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2005; 1(3): 129.
18. Tarver T. Cancer facts & figures. American cancer society (ACS) Atlanta, GA: American Cancer Society, 2012: 66., pdf. Available from.
19. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. In: *Chemosensitivity 2005*: 21-8. Humana Press.
20. Dong Y, Ji G, Cao A, Shi J, Shi H, Xie J, Wu D. Effects of sinensetin on proliferation and apoptosis of human gastric cancer AGS cells. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*. 2011; 36(6): 790-4.
21. Saidan NH, Hamil MS, Memon AH, Abdelbari MM, Hamdan MR, Mohd KS, Majid AM, Ismail Z. Selected metabolites profiling of *Orthosiphon stamineus* Benth leaves extracts combined with chemometrics analysis and correlation with biological activities. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015; 15(1): 350.
22. Keshmiri-Neghab H, Goliaei B, Nikoofar A. Gossypol enhances radiation induced autophagy in glioblastoma multiforme. *General physiology and biophysics*. 2014; 33(4): 433-42.
23. Steel GG, Adams GE, Horwich A. The biological basis of radiotherapy 1989.
24. Chen MF, Wu CT, Chen YJ, Keng PC, Chen WC. Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *Journal of radiation research*. 2004; 45(2): 253-60.
25. Zeng L, Zhen Y, Chen Y, Zou L, Zhang Y, Hu F, Feng J, Shen J, Wei B. Naringin inhibits growth and induces apoptosis by a mechanism dependent on reduced activation of NF- κ B/COX 2 caspase-1 pathway in HeLa cervical cancer cells. *International journal of oncology*. 2014; 45(5): 1929-36.
26. Sp N, Kang D, Kim D, Park J, Lee H, Kim H, Darvin P, Park YM, Yang Y. Nobiletin inhibits CD36-dependent tumor angiogenesis, migration, invasion, and sphere formation through the Cd36/Stat3/Nf-Kb signaling axis. *Nutrients*. 2018; 10(6): 772.