

اثرات پلی فنول دالبرجین بر تغییرات بیولوژیکی پرتو یونیزان اشعه ایکس بر روی رده سلولی T47D

خلاصه

مقدمه: سرطان پستان رایج ترین سرطان تشخیصی در زنان و عامل اصلی مرگ در آنها است. سرطان پستان حدود یک سوم از کل سرطان های زنان را تشکیل می دهد که در صورت تشخیص به موقع می تواند به یکی از سرطان های قابل علاج تبدیل گردد. رده سلولی T47D جزء رده سلولی کارسینوم هست که به عنوان رده سلولی با منشأ سرطانی مورد استفاده قرار می گیرند. T47D نماینده گروهی از سلول های سرطان سینه با ویژگی ER^{+} با گیرنده های استروژنی α و β و گیرنده پروژسترون می باشد. پلی فنول ها احتمالاً مهم ترین ترکیبات گیاهی هستند که تاکنون شناسایی و مطالعه شده اند. دالبرجین از نئوفلانونوئیدهای سنتز شده است، نئوفلانونوئیدها دارای اثر سیتوتوکسیک هستند که سمیت ویژه توموری دارد. گیاه *Dalbergia sisso* در ایران با نام گیاه جک یا شیشم نامیده و در مناطق جنوب ایران کشت داده می شود. امروزه، درمان ترکیبی توسط پرتو بسیار حائز اهمیت می باشد، درمان ترکیبی توسط پرتو انواع مختلفی دارد یکی از آن موارد استفاده از داروها و پرتوهای درمانی همزمان با مصرف دارو در جهت کاهش انواع بیماری های سرطان می باشد.

روش بررسی: در این پژوهش تأثیر داروی دالبرجین بر روی رده سلولی T47D به وسیله غلظت سنجی، پرتو دهی و آپتوز بررسی گردید. سلول های سرطانی سینه رده T47D تحت تیمار دالبرجین با غلظت های 0.00001 ، 0.0001 ، 0.001 ، 0.01 ، 0.1 و 1 میکرومولار قرار گرفته اند. بعد از گذشت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک MTT با غلظت نهایی 0.5 mg/ml در محیط کشت در هر چاهک افزوده شد. پس از گذشت سه ساعت از زمان انکوباسیون، رسوب آبی فورمازان مشاهده شد. در مرحله بعد، قدرت کلونی زایی سلول ها در حضور پلی فنول دالبرجین و پرتو به صورت همزمان مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین رده سلولی T47D و با تراکم 20000 cell/cm^2 در پلیت های ۲۴ چاهکی کشت داده شدند و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان کشت سلول های T47D میزان بقا و آپتوز سلول ها بررسی شد.

یافته ها: نتایج به دست آمده در محیط آزمایشگاه نشان داد که داروی دالبرجین به تنهایی یک داروی مؤثر بر روی درمان رده سلولی T47D کشت داده شده است که منجر به نابودی

فرشته مهدی زاده و لوجردی^۱

بهرام گلیایی^۲

کاظم پریور^۳

علیرضا نیکوفر^۴

۱. دکتری بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. دکتری بیوفیزیک، گروه بیوشیمی فیزیک، دانشکده IBB، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. دکتری زیست شناسی سلولی و تکوینی، جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۴. متخصص پرتودرمانی، گروه رادیوتراپی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

آن‌ها می‌شود. بنابراین مناسب‌ترین زمان برای درمان این نوع سلول‌های سرطانی ۴۸ ساعت و غلظت کشندگی این دارو در رده سلولی T47D بررسی و ۰/۰۰۱ میکرومولار می‌باشد. همچنین این دارو در حضور پرتوی یونیزان اشعه ایکس خاصیت حساسیت پرتویی بیشتری را از خود نشان می‌دهد و منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی گردیده شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که درمان ترکیبی پرتوهای یونیزان و پلی‌فنول دالبرجین به‌عنوان درمان سرطان سلول‌های T47D کشت داده شده در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند به‌کار گرفته شود. بنابراین این دارو مانند سایر پلی‌فنول‌های گیاهی می‌باشد و با توجه به میزان غلظت کشندگی آن اثر پرتویی خود را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: سرطان سینه (T47D)، پرتودرمانی، دالبرجین، درمان ترکیبی

نویسنده مسئول: کاظم پریور تلفن: ۰۹۱۲۱۳۰۴۵۵۰

پست الکترونیک: kazem_parivar@yahoo.com

مقدمه

اشاره کرد که امروزه زمینه تحقیقات وسیعی از جمله بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی را به‌خود اختصاص داده‌اند [۳]. پلی‌فنول‌ها احتمالاً مهم‌ترین ترکیبات گیاهی هستند که تاکنون شناسایی و مطالعه شده‌اند. هزاران مولکول دارای ساختار پلی‌فنولی (گروه‌های هیدروکسیل متعدد و حلقه‌های آروماتیک) در گیاهان پیشرفته و صدها نوع از آن‌ها نیز در گیاهان خوراکی شناسایی شده‌اند. پلی‌فنول‌ها، متابولیک‌های ثانویه در گیاهان هستند که از آن‌ها در مقابل شرایط مختلف استرس مانند عوامل بیماری‌زا و یا خطر حیوانات گیاه‌خوار حفاظت می‌کنند. پلی‌فنول‌ها از آمینواسید فنیل آلانین مشتق شده‌اند و آن‌ها را می‌توان براساس تعداد حلقه‌های فنولی در ساختمانشان و یا اجزاء ساختاری که موجب اتصال این حلقه‌ها به یکدیگر می‌شود، طبقه‌بندی کرد. بر این اساس پلی‌فنول‌ها شامل چهار گروه فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، لیگنان‌ها و استیلین‌ها می‌باشند، هرکدام از گروه‌های نامبرده با داشتن ویژگی‌ها و گروه‌های عاملی متفاوت خود به زیرگروه‌هایی تقسیم‌بندی می‌شود [۴ و ۵]. دالبرجین از نئوفلاونوئیدها سنتز شده است. نئوفلاونوئیدها یک سیتوتوکسیک که سمیت اختصاصی توموری دارد. دالبرجین (DBN) از چوب *Dalbergia sisso* به‌دست می‌آید که معمولاً به‌عنوان چوب کریستال شمالی نامیده می‌شود. یک درخت سرخ مایل به قرمز می‌باشد که به‌سرعت در حال رشد است. برگ آن مرکب با برگچه‌های قلبی شکل است، ارتفاع این گیاه تابیش از ۱۰ متر می‌رسد. در مناطق بومی ساحل شبه قاره هند و جنوب ایران است. جنس دالبرجیا از یک گونه به نام سیسیو (*D. Sisso*) که در ایران به نام جک یا شیشم معروف است. دالبرجین از 2H-1-Benzopyran-2-one تولید شده است. DBN با فرمول شیمیایی C₁₆H₁₂O₄ بیان می‌شود. این گیاه برای درمان انواع خونریزی‌ها، دردها، تب، درد معده، سیفیلیس و ضدمیکروب قارچی

سرطان یک بیماری مهلک با آمار مرگ و میر بالا است که درگیری‌های روانی و اقتصادی زیادی را به‌دنبال دارد. سرطان در واقع رشد و تکثیر کنترل نشده سلول‌های غیر طبیعی در بدن می‌باشد. شایع‌ترین نوع سرطان سینه از لحاظ بافت‌شناسی کارسینوما می‌باشد که شبیه سایر نئوپلاسم‌های اپیتلیالی با تعدادی مراحل پشت سرهم شامل ناهنجاری گسترده اپیتلیال، هایپرپلازی غیرنرمال کارسینوما در محل و کارسینوما مهاجم مشخص می‌گردد. این تغییرات توسط تعداد زیادی از آزمایشات ژنتیکی و ایمنوهیستوشیمی تأیید شده‌است [۱]. سل‌لاین T47D رده سلولی کارسینوم هستند و به‌عنوان رده سلولی با منشأ سرطانی استفاده می‌شوند. T47D نماینده گروهی از سرطان سینه با ویژگی ER⁺ که دارای گیرنده‌های استروژنی α و β و گیرنده پروژسترون می‌باشد. هر دو دارای زیر گروه لومینال A هستند و نوع توموری کارسینوما مجاری لنفی مهاجم هستند که دارای ویژگی چسبندگی قوی و توانایی تشکیل اسفروئید، متاستاز ضعیف و مقاومت پرتویی بالایی هستند. استروژن α و β نقش در تکثیر سلول‌های سینه و رحم و پروستات دارد ولی استروژن α خیلی بیشتر است و استروژن β نقش کمتری دارد. استروژن α از AP-1 رونویسی می‌شود و استروژن β از طریق هورمون‌ها بیان می‌شود. این دو سلول وقتی رشد می‌کنند شکل گنبدی است و از طرفی می‌تواند با فاکتور نکروز تومور ($\text{TNF}\alpha$) و با استفاده از ترکیبات ضد استروژن مانع از رشد سلول‌های T47D شود [۲]. در حال حاضر جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی از رایج‌ترین درمان‌های سرطان سینه هستند. اما، به‌دلیل عوارض جانبی بالینی این درمان‌ها محققان به‌دنبال یافتن درمان‌های جایگزین، مکمل یا حتی ترکیبی که در عین داشتن کارایی بالا، عوارض جانبی کمتری نیز دارند، می‌باشند. از انواع این درمان‌ها می‌توان به استفاده از ترکیبات گیاهی

روش بررسی

مواد و وسایل آزمایش

رده سلولی T47D از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. محیط کشت RPMI از شرکت Gibco (USA)، سرم جنین گوساله (Sigma-GIBCO USA:10270)، آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین (Aldrich USA)، استرپتومایسین (TORGE-Germany) و داروسازی جابرین حیان) و سدیم بی کربنات (Merck, Germany) استفاده شد. پودر دی فنیل-تترازولیوم برامید (Sigma-Aldrich USA)، اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج از شرکت (Sigma-Aldrich USA) تهیه گردید و همچنین در تمامی آزمایش‌ها از آب مقطر دیونیزه استفاده شد.

کشت و پاساژ سلول

هر دو رده سلولی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین در ۷۲۰ میلی گرم در لیتر و پنی سیلین در ۳۰۰ میلی گرم در لیتر اضافه شد. تراکم اولیه برای کشت رده سلولی T47D برابر $2 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ بوده است. زمانی که دانسیته سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد می‌رسید، سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند.

سنجش MTT

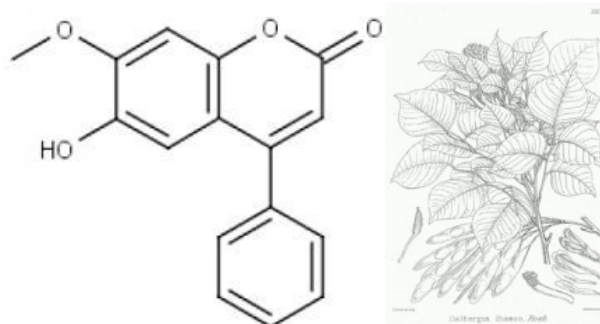
از این آزمون برای سنجش سمیت دارو استفاده می‌شود زیرا ماده‌ای زرد رنگ دی متیل تیزازول - دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) زمانی که به درون سلول وارد شود، زنجیره تنفسی و سیستم‌های انتقال الکترون و سایر نمک‌های تترازولیوم را احیاء می‌کنند و کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ نامحلول در سلول تشکیل می‌شود به این منظور، رده سلولی T47D با تراکم $2 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ ، در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شد و در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت سلول‌ها تحت تیمار دالبرجین با غلظت‌های 1×10^{-6} ، 1×10^{-5} ، 1×10^{-4} و 1×10^{-3} میکرومولار قرار گرفته‌اند. بعد از گذشت زمان‌های ذکر شده ۱۰۰ میکرولیتر از استوک MTT با غلظت نهایی 0.5 mg/ml در محیط کشت در هر چاهک اضافه شد. بعد از سه ساعت از زمان انکوباسیون، رسوب آبی فورمازان مشاهده شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO به هر چاهک اضافه شد و جذب محلول هر چاهک توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر (مربوط به جذب رنگ MTT) و ۶۳۰ نانومتر (مربوط به جذب زمینه) سنجیده شد.

بررسی کلنی‌زایی پس از پرتودهی یونیزان ایکس

در این آزمایش رده سلولی T47D با تراکم $2 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ در پلیت‌های ۲۴ چاهکی کشت داده شدند. بعد از رسیدن سلول‌ها به

که در طب سنتی استفاده می‌شود. از این گیاه می‌تواند در ساخت ترکیبات دارویی استفاده قرار نمود و همچنین ترکیب دالبرجین خاصیت آنتی اکسیدان قوی دارد (شکل ۱) [۷].

پرتودرمانی عبارت است از استفاده از پرتوهای یونیزان جهت کنترل و درمان بافت‌های سرطانی که به عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌ها در معالجه بسیاری از سرطان‌ها شناخته شده است. مبنای این روش اثرات متقابل پرتوهای یون‌ساز با مواد و همچنین اثرات بیولوژیک این پرتوها می‌باشد. شدت و انرژی پرتوهای مورد استفاده در پرتودرمانی باید به حدی باشد که بتوان با استفاده از آن‌ها اثرات بیولوژیک مخرب به سلول‌های سرطانی وارد نمود. هدف از پرتودرمانی از بین بردن حداکثر سلول‌های سرطانی با حداقل آسیب به بافت‌های سالم بدن است. در صورتی که پرتودرمانی به‌طور انتخابی باعث افزایش شدت آسیب در بافت‌های تومورال و کاهش ایجاد آسیب‌های ناخواسته در بافت‌های سالم بدن و همچنین عدم ایجاد مقاومت درمانی در بافت‌های تومورال شود، این امر گامی 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 و تکمیل دوره درمان و به‌طور کلی شکست درمان می‌گردد. متأسفانه از سوی دیگر، کاهش دوز درمانی مؤثر باعث عدم ریشه‌کنی کامل تومور و عود مجدد سرطان می‌شود. موفقیت یک استراتژی با هدف بهبود درمان سلول‌های سرطانی به معنای تخریب کامل سلول‌های سرطانی و عدم عود مجدد، بستگی به افزایش سمیت در سلول‌های سرطانی و کاهش اثرات مخرب جانبی در بافت‌های نرمال مجاور در یک زمان دارد [۸]. آمار روبه افزایش مبتلایان به سرطان به ویژه سرطان سینه و اهمیت درمان آن، خواص آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی دالبرجین و وجود مطالعات اندک در رابطه با اثرات پرتوی یونیزان اشعه ایکس بر سلول‌های سرطانی ما را بر آن داشت تا در این مطالعه اثر دالبرجین و پرتوی یونیزان را به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر بر بقای سلولی و آپوپتوز در سلول‌های سینه انسانی بررسی کنیم.



شکل ۱: شکل سمت راست گیاه دالبرجین را نشان می‌دهد و همچنین شکل سمت چپ فرمول شیمیایی دالبرجین $C_{16}H_{12}O_4$ را نشان می‌دهد.

مشاهده سلول‌های آپوتوتیک و بررسی کیفی

در این آزمون ۴ گروه مورد بررسی قرار گرفتند:

(الف) بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان کشت سلول T47D میزان بقا و آپوتوز سلول بررسی شد.

(ب) سلول‌ها تحت تیمار با دالبرجین و میزان بقا آن‌ها سنجیده شد.

(ج) سلول‌ها تحت تابش پرتوی اشعه ایکس قرار گرفتند و آپوتوز آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

(د) سلول‌ها تحت تیمار با دالبرجین و پرتوی اشعه ایکس به صورت همزمان قرار گرفتند و سپس مقدار رشد و بقای آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته شد.

(الف) سلول‌های کشت‌داده‌شده بعد از رسیدن به دانسیته مورد نظر تریپسینه و از کف پلیت جمع‌آوری شدند، سپس سانتریفوژ شدند (با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه) سلول‌ها توسط بافر فسفات نمکی شست و شو داده شدند و محیط رویی خارج شد. رسوب سلولی با ۲۵ میکرولیتر بافر فسفات نمکی سرد و ۲ میکرولیتر از رنگ‌های اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج سوسپانسیون شد و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های رنگ‌شده روی لام ریخته و لامل بر روی آن قرار گرفته شد و سپس توسط میکروسکوپ مستقیم فلورسانس با بزرگ‌نمایی $\times 40$ تحت تابش نور آبی تصویربرداری صورت گرفت.

(ب) تیمار سلول‌ها با دالبرجین به این صورت عمل شد که سلول T47D تحت تیمار دالبرجین با غلظت‌های 0.001 میکرومولار در مدت زمان ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سلول‌ها تریپسینه و از کف پلیت جمع‌آوری شدند، سپس سانتریفوژ و با محلول PBS شست و شو داده شدند و محیط رویی خارج شد. رسوب سلولی با ۲۵ میکرولیتر بافر فسفات نمکی سرد و ۲ میکرولیتر از مخلوط رنگ‌های اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج سوسپانسیون شد و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های رنگ‌شده روی لام ریخته و لامل بر روی آن قرار داده شد و توسط میکروسکوپ مستقیم فلورسانس با بزرگ‌نمایی $\times 40$ تحت تابش نور آبی تصویربرداری گردید.

(ج) در این مرحله هر دو رده سلولی کشت داده شدند و تحت تیمار با اشعه ایکس (دوز ۴ گری) قرار گرفتند سپس سلول‌ها تریپسینه و سانتریفوژ شدند. سلول‌ها با محلول PBS شست و شو داده شدند و محیط رویی خارج شد. رسوب سلولی با ۲۵ میکرولیتر بافر PBS سرد و ۲ میکرولیتر از مخلوط رنگی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید سوسپانسیون شد و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های رنگ‌شده روی لام ریخته و لامل بر روی آن قرار داده شد و توسط میکروسکوپ مستقیم فلورسانس با بزرگ‌نمایی $\times 40$ تحت تابش نور آبی تصویربرداری انجام گردید.

(د) میزان آپوتوز رده سلولی T47D بعد درمان ترکیبی (تابش پرتویی

تراکم مورد نظر، پلیت‌ها توسط پارافیلیم پوشیده شد و همچنین نمونه‌ها با استفاده از یخ به بیمارستان پارس در مدت زمان ۱۰ دقیقه جهت پرتودهی منتقل گردیده شد. دستگاه اشعه ایکس که در این بیمارستان قرار داشت، از نوع پریموس شرکت زیمنس آلمان بود که قبل از ورود به قسمت پرتودهی اطلاعات مندرج در جدول ۱ به اپراتور دستگاه داده شد، (مساحت ناحیه پرتودهی، فاصله منبع تابش تا کف پلیت و دوز مورد نظر به صورت سانتی گری) از این موارد هستند. در نهایت سلول‌ها تحت دوزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ گری پرتوی ایکس قرار گرفتند و یک پلیت کنترل به همراه سایر پلیت‌ها به اتاق پرتودهی برده شد تا اثر دوز پس‌زمینه محیط خللی در نتیجه آزمایش ایجاد نکند.

بعد از پرتودهی سلول‌ها تریپسینه و شمارش سلولی انجام شد. جهت تشکیل کلنی تعداد معینی از سلول‌ها طبق جدول ۲ در پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری کشت داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان لازم برای تشکیل کلنی، کلنی‌ها تثبیت و رنگ‌آمیزی شدند.

سلول‌های تیمار شده با دالبرجین و پرتو

توانایی کلنی‌زایی سلول‌ها در درمان ترکیبی مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول T47D با تراکم 20000 cell.cm^2 در پلیت‌ها کشت داده شدند سپس تحت تیمار دالبرجین با غلظت‌های 0.001 میکرومولار قرار گرفته‌اند. محیط کشت سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت تیمار با دالبرجین، با محیط کشت تازه حاوی ۱۰ درصد سرم تعویض شد. به منظور پرتودهی، پلیت‌ها با گذر زمان ۱۰ دقیقه به بیمارستان پارس منتقل گردیدند و تحت تابش ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ گری پرتو قرار گرفتند. بعد از آن سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند. تعداد معینی (مطابق جدول ۳) در پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری کشت داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان لازم، کلنی‌ها رنگ‌آمیزی و شمارش شدند و در نهایت راندمان کشت سلولی و کسر بقا محاسبه گردید.

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

سلول‌های T47D انتخاب گردید. در نهایت برای به‌دست‌آوردن کسر بقاء از رابطه زیر استفاده شد. براساس رابطه ۲ کسر بقاء = راندمان کشت نمونه تیمار شده / راندمان کشت نمونه شاهد محاسبه گردید. جدول ۲ و ۳ به ترتیب تعداد سلول‌های کشت داده شده T47D بر حسب دوزهای مختلف اشعه ایکس و تعداد سلول‌های کشت داده شده T47D و (بعد از تیمار با دالبرجین) بر حسب دوزهای مختلف اشعه ایکس را نشان می‌دهد و همچنین شکل ۲ تصاویر کلنی‌ها را نشان می‌دهد. شکل‌های (الف و ب) به ترتیب معرف سلول‌های T47D قبل و بعد از پرتو و تیمار دالبرجین است.

سنجش آپوپتوز در رده سلولی T47D

از این تست برای شناخت مشخصات ظاهری سلول‌های سالم، آپوپتوزی در مراحل اولیه یا ثانویه و یا نکروزی استفاده شد. هر دو رده سلولی زمانی که در مرحله قبل آپوپتوز باشند، ظاهری سبز رنگ دارند در زمان تابش پرتویی این سلول‌ها زرد رنگ هستند، در هنگام مراحل اولیه آپوپتوز سلول‌ها به رنگ سبز-نارنجی و در انتهای آپوپتوز به رنگ نارنجی دیده می‌شوند. طبق منحنی‌هایی که در زیر آورده شده است، در هنگام تیمار سلول‌ها با دارو و پرتو بیشترین درصد آپوپتوز مشاهده شد. (نمودار ۳ و جدول ۴ و شکل ۳)

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به اهمیت ترکیبات فنولی در درمان سرطان و همچنین شناخت پرتوهای یونیزان بر سلول‌های سرطانی، در این مطالعه اثر دالبرجین به عنوان ترکیب فنولی در حضور پرتو یونیزان بر بقاء و آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه انسانی رده T47D بررسی گردید. پلی‌فنول‌ها گروهی از مواد شیمیایی هستند که در گیاهان، میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند. مطالعات مختلف نشان داده است که رژیم غذایی حاوی ترکیبات فنولی، پتانسیل پیشگیری از سرطان را دارد و ارتباط معکوس بین مصرف رژیم غذایی حاوی ترکیبات فنولی و خطر ابتلا به سرطان مشاهده شده است [۹]. پلی‌فنول‌ها یک کلاس ساختاری عمدتاً طبیعی، مصنوعی یا نیمه‌مصنوعی، مواد شیمیایی و آلی هستند [۱۰]. طبقه‌بندی فنول‌ها بر این اساس می‌باشد: دسته اول فنولیک‌اسید، دسته دوم فلاونوئید (ایزوفلاونوئید، نئوفلاونوئید، چالکون، فلاونز، فلاونول، پروآنتوسیانیدین، آنتوسیانیدین)، دسته سوم پلی‌فنولیک‌اسید و دسته پایانی شامل دیگر پلی‌فنول‌ها می‌باشد. پلی‌فنول دالبرجین از دسته دوم فلاونوئید است و جزء گروه نئوفلاونوئیدها می‌باشد [۱۱]. دالبرجین با فرمول شیمیایی C₆H₁₂O₄ و با نام صنعتی ۶ هیدروکسی ۷ متوکسی ۴ فنیل کومارین خوانده می‌شود [۱۲]. گیاه دالبرجیا سیسو در ایران با نام گیاه جک یا شیشم نامیده می‌شود و در مناطق جنوب ایران کشت داده می‌شود. این گیاه بسیار شبیه به گونه گیاهی تلخ‌بیان می‌باشد. امروزه، ترکیباتی مانند

و پلی‌فنول دالبرجین به‌صورت هم‌زمان) در این قسمت انجام شد، پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۰/۰۰۱ میکرومولار دالبرجین با محیط کشت تازه حاوی ۱۰ درصد سرم بدون دالبرجین قرار گرفتند سپس تحت تیمار با اشعه ایکس (دوز ۴ گری) قرار گرفتند و به مدت ۱ تا ۶ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شدند، پس از گذشت این زمان، سلول‌ها تریپسینه و جمع‌آوری شدند سپس از سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰ در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند، سلول‌ها با محلول PBS شست و شو داده شدند و محیط رویی خارج گردید. رسوب سلولی با ۲۵ میکرولیتر بافر فسفات نمکی سرد و ۲ میکرولیتر از مخلوط رنگی آکریدین‌اورنج و اتیدیوم بروماید سوسپانسی شد و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های رنگ‌شده روی لام ریخته و لامل بر روی آن قرار داده شد و توسط میکروسکوپ مستقیم فلورسانس با بزرگ‌نمایی ۴۰× تحت تابش نور آبی عکسبرداری صورت گرفت.

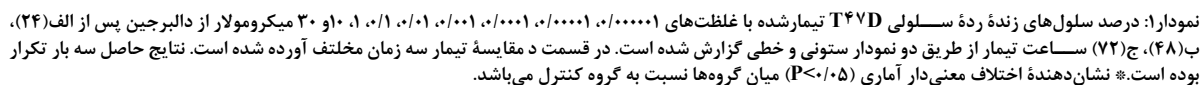
یافته‌ها

ارزیابی اثرات دالبرجین بر رشد سلول‌های T47D

در این آزمون رده سلولی T47D تحت تیمار با دالبرجین با غلظت‌های نهایی ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ می‌کرومولار قرار گرفتند. به‌منظور به‌دست‌آوردن بهترین زمان تیمار دالبرجین بر روی سلول، زمان‌های تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودار ۱ (الف، ب، ج، د)، تیمار رده T47D در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمایش داده شده است و همچنین نمودار د مقایسه تیمار سه زمان مختلف را نشان می‌دهد. براساس منحنی MTT assay، غلظت مهاری ۵۰ درصدی بعد از تیمار ۲۴ ساعت دالبرجین برای سلول T47D ۱ میکرومولار بوده است درحالی‌که بعد از تیمار ۴۸ ساعت غلظت ۵۰ درصد مهاری این دارو در سلول‌های T47D برابر با ۰/۰۰۱ میکرومولار بوده است (کاهش غلظت دالبرجین). غلظت‌های ۰/۰۰۰۰۱ در زمان ۷۲ ساعت مربوط به سلول T47D است (کمترین غلظت مهاری ۵۰ درصدی). طبق این یافته می‌توان گفت که تیمار با دالبرجین باعث کاهش سرعت رشد سلول‌ها شده است. براساس رابطه ۱ درصد بقاء سلول‌های تیمار شده = (میانگین جذب سلول‌های تیمار شده) / (میانگین جذب سلول‌های شاهد) × ۱۰۰ محاسبه گردید.

تأثیر پرتوی یونیزان و تیمار ترکیبی دالبرجین و پرتوی یونیزان ایکس سلول T47D

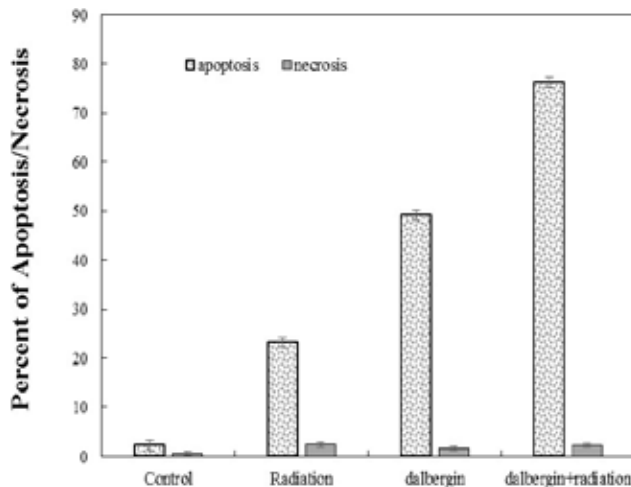
در نمودار ۲ منحنی بقاء رده سلولی T47D قبل و بعد از درمان ترکیبی نشان داده شده است. با استفاده از نرم‌افزار مطلب این داده‌ها بر مدل خطی درجه دو منطبق گردید. در صورت مقایسه این نمودارها با زمان قبل از تیمار ترکیبی، منحنی بقاء کاهش بیشتری یافته است و این امر نشان‌دهنده مرگ بیشتر سلول‌ها در مواجهه با پرتو و دالبرجین است و بهترین دوز انتخاب شده ۴ گری برای مرحله سنجش آپوپتوز در



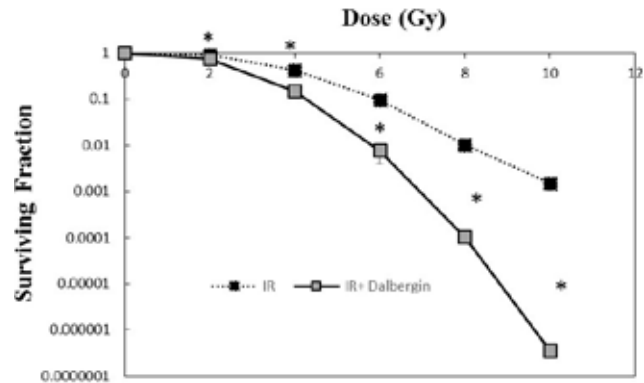
ایزوفلاون‌ها و بیوجنین یافته‌شده عامل پیشگیری شیمی‌درمانی سرطان دارد و همچنین به‌تازگی فعالیت‌های استروژن از گل‌های این گیاه یافت شده است. در سال‌های اخیر، مطالعات دارویی قوی روی این گیاه در حال انجام می‌باشد [۱۳]. این ترکیبات دالبرجین در گیاهان دالبرجیاسیسو در چوب این گیاه بسیار فراوان است. ترکیب دالبرجین خاصیت آنتی‌اکسیدان قوی دارد. هدف از پرتودرمانی از بین بردن حداکثر سلول‌های سرطانی با حداقل آسیب به بافت‌های سالم است. کاربرد اصلی پرتودرمانی در معالجه و یا تقلیل امراض سرطانی می‌باشد [۱۴]. پرتودهی ممکن است توسط دستگاهی خارج از بدن (رادیوتراپی خارجی) و یا توسط منبع پرتو در داخل بدن (رادیوتراپی داخلی) و یا توسط مواد رادیواکتیو باز در داخل

جدول ۲: تعداد سلول‌های کشت داده‌شده $T4^vD$ بر حسب دوزهای مختلف اشعه ایکس

دوز پرتو (گری)	۰	۲	۴	۶	۸	۱۰
رده سلولی T47D	۵۰۰	۷۵۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰	۸۰۰۰	۱۶۰۰۰

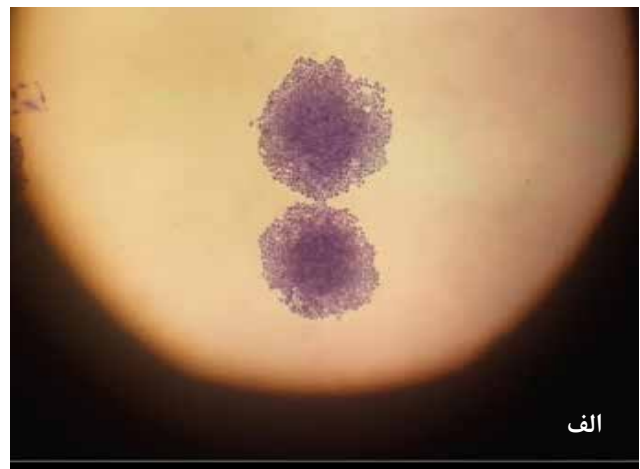


نمودار ۳: مقایسه آپوپتوز در نمونه‌های مختلف از کشت T۴۷D است

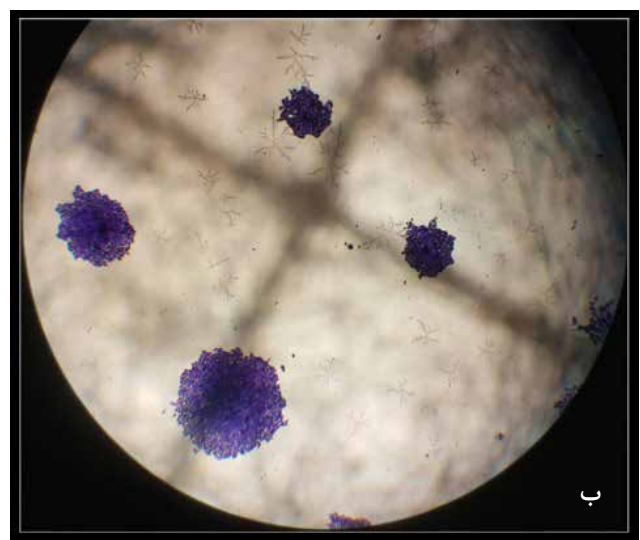


نمودار ۲: نمودارهای بقاء رده سلولی T۴۷D بر حسب دوزهای مختلف پرتوی یونیزان و تیمار ترکیبی دالبرجین و پرتوی یونیزان ایکس. اختلاف بین منحنی‌های بقاء گروه کنترل و کنترل حلال DMSO به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. نتایج نشان‌دهنده سه بار تکرار است و نمودار حاصل نتایج این سه بار تکرار است. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است $P < 0.05$ میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل مربوطه می‌باشد.

یکی از استراتژی‌های مهم در درمان رادیوتراپی است [۱۵]. برای همین امروزه از درمان‌های ترکیبی استفاده می‌شود و بسیار تأثیر به‌سزایی در روند بهبود بیماری دارد. بنابراین برای بررسی میزان کشندگی دارو بر روی سلول‌ها از تست MTT استفاده شد. دالبرجین که عضو گروه خانواده نئوفلانوئیدها است، باعث کاهش بقاء، در رده‌های سلولی شده است. منحنی بقاء رده سلولی T47D بعد از تیمار دالبرجین کاهش یافته است. طبق تحقیقات انجام‌شده در سال ۲۰۱۶ این نئوفلانوئیدها باعث مرگ سلول‌های سرطان لوسمی انسانی شده است [۱۶]. می‌توان نتیجه گرفت پلی‌فنول دالبرجین اثرات افتراقی در زمینه سمیت، رشد و تکثیر و بقاء سلول‌های سرطان سینه انسانی T47D ایفا می‌کند. فاجعه میتوزی و پیری سلولی از نوع مرگ‌های ناشی از پرتو می‌باشد و سلول‌ها توانایی کلنی‌زایی را از دست می‌دهند. با این تفاوت که در فاجعه میتوزی فاقد توانایی در نقاط G2 و M می‌باشد و در نتیجه آسیب وارد به DNA بدون ترمیم وارد میتوز می‌شود. در نتیجه سلول‌ها با یک هسته بزرگ یا چندین هسته‌ای ایجاد می‌شود و بعد از دو تا سه تقسیم دچار مرگ سلولی می‌شوند [۱۷]. اما پیری سلولی در نتیجه جهش در ژن p53 و افزایش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور در مرز G1 ایجاد می‌شود. فاز G0 دوره‌ای است که در چرخه سلولی، سلول به‌صورت ساکن باقی می‌ماند و این بدان معنا است که به‌نظر می‌رسد سلول در یک فاز طولانی G1 قرار گرفته



الف



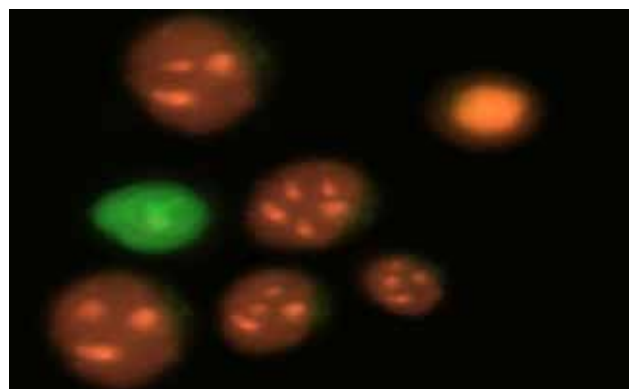
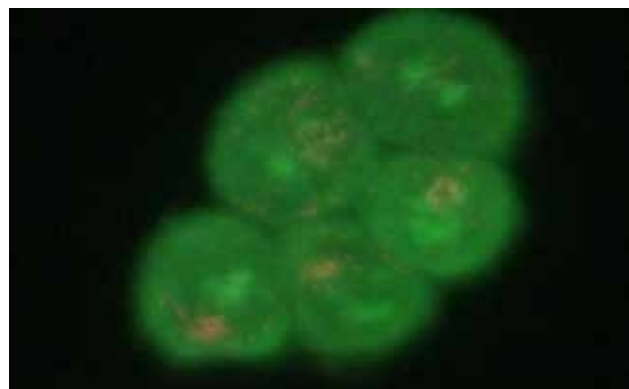
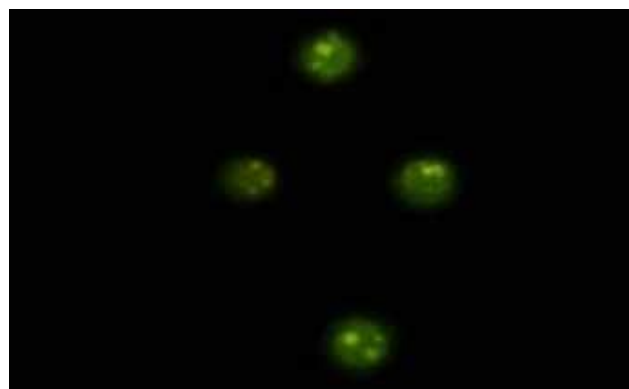
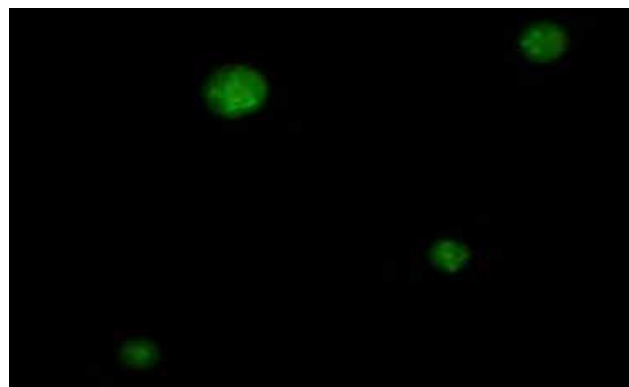
ب

شکل ۲: تصاویر کلنی‌ها قبل و بعد از پرتودهی با اشعه ایکس و تیمار ترکیبی دالبرجین و پرتوی یونیزان ایکس

جدول ۵: درصد آپوپتوز و نکروز برای نمونه‌های کشت T۴۷D

	Apoptosis	Necrosis
Control	۲.۲۵۷۵۲۵۲۶۴	۰.۵۱۱۸۳۷۸۶۸
Radiation	۲۳.۲۴۵۹۸۳۰۶	۲.۳۱۰۳۲۹۹۲
Dalbergin	۴۹.۱۶۵۵۶۹۴۸	۱۶.۲۴۲۱۸۷۶۲
Dalbergin+Radiation	۷۶.۳۰۱۹۶۸۳۷	۲.۲۰۴۵۸۰۱۶۸

است و قابلیت تقسیم ندارد [۱۸]. اثر مشاهده شده و آنالیزهای آماری نشان می‌دهد که میانگین کسر بقاء در حالت کنترل و تیمار با دارو و پرتو اختلاف معنی‌دار ندارد اما، در دوزهای $P\text{-Value} < 0.05$ ، ۸، ۶، ۴، ۲، ۰، ۱۰ گری که نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین کسر بقاء در دو گروه تیمار پرتویی و تیمار ترکیبی است. این اثرها را این‌گونه می‌توان توضیح داد که پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک یا پروتئین‌های القاء‌کننده بقاء در حفظ انسجام عملکرد میتوکندری نقش دارد. این پروتئین‌ها از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری می‌نماید و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند [۱۹]. از منحنی درجه دوم برای بررسی اثر حساس‌کنندگی پرتویی ترکیب با دالبرجین و تفسیر نمودارهای حاصله از منحنی درجه دو استفاده می‌شود. پارامترهای α و β سهم مربوط به دوزهای پایین و بالا است [۲۰]. سلول‌های سرطان سینه انسانی زمانی که با پلی‌فنول دالبرجین تیمار شدند و سپس تحت تابش پرتو قرار گرفته‌اند، نسبت به حالتی که فقط پرتو دهی صورت گرفته پارامتر β افزایش پیدا کرده و مرگ سلولی افزایش یافته است. در پلی‌فنولی که خاصیت حساس‌کنندگی پرتو داشت، درمان‌های ترکیبی در مدت‌زمان تیمار کوتاه‌تری انجام گرفته بود [۲۱]. در این مطالعه به‌منظور سنجش آپوپتوز بعد از هر مرحله تیمار سلولی از روش کیفی برای سنجش آپوپتوز استفاده شد. در این روش به‌منظور مشاهده سلول‌های آپوپتیک و نکروتیک از دو رنگ فلورسانس آکریدین اورنج و اتیدیدوم بروماید استفاده شد. رنگ آکریدین اورنج یک رنگ کاتیونی است و به‌صورت انتخابی به DNA سلول‌ها از طریق اینترکالیشن متصل می‌گردد و هنگامی که به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود یعنی با نور آبی تحریک می‌شود و رنگ سبز با طول‌موج ۵۲۵ نانومتر و زمانی که به DNA تک‌رشته‌ای و یا RNA متصل شود انترکلیت می‌شود یعنی با نور آبی تحریک می‌شود و رنگ نارنجی با طول‌موج ۶۵۰ نانومتر ساطع می‌کند. اتیدیدوم بروماید سلول‌هایی را رنگ کرده که تمامیت غشای خود را از دست داده‌اند و طول‌موج جذب آن در اتصال به DNA ۵۱۰ نانومتر است در نتیجه سلول‌ها رنگ نارنجی به‌خود می‌گیرند. لازم به ذکر است که وجود نقاط سبز درخشان در هسته نشان‌دهنده متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته است، بیانگر مرحله اولیه آپوپتوز است. سلول‌ها در مرحله انتهایی آپوپتوز و یا نکروز تمامیت غشای خود را از دست می‌دهد و در نتیجه رنگ اتیدیدوم بروماید وارد سلول و هسته می‌شود و این رنگ تحت تأثیر نور فلورسانس قرمز رنگ دیده می‌شود. سلول‌های نکروز شده به رنگ نارنجی می‌باشد اما، کروماتین آن‌ها قطعه قطعه نمی‌شود. با این روش می‌توان سلول‌های آپوپتیک و نکروتیک را مشاهده کرد [۲۲]. طبق بررسی و آنالیز آماری انجام‌شده، اختلاف بین سلول‌های آپوپتوزی در مراحل اولیه، ثانویه و یا نکروزی در گروه کنترل و کنترل حلال DMSO در هر دو رده سلولی به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. این اختلاف معنی‌داری بین درصد سلول‌های آپوپتوزی در مراحل اولیه سلولی با غلظت ۰/۰۰۱ نسبت به



شکل ۲: تصاویر الف (کنترل)، ب (پرتو)، ج (دالبرجین) و د (پرتو و دالبرجین) مربوط به سلول‌های T۴۷D که مشخصات ظاهری سلول‌های سالم، آپوپتوزی در مراحل اولیه یا ثانویه و نکروزی به‌صورت شماتیک با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیدوم بروماید در زیر میکروسکوپ فلئورسانس با بزرگ‌نمایی ۴۰×

گروه کنترل وجود دارد. داده‌ها نشان می‌دهد که میزان افزایش درصد سلول‌های آپوپتوزی در رده سلولی T47D است. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که پلی‌فنول جنیستئین توانایی ایجاد حساسیت افتراقی بین سلول‌های بدخیم اپیتلیالی سینه انسان مانند MDA-MB-231 را دارد و باعث القاء آپوپتوز شده است [۲۳ و ۲۴]. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در آزمایشگاه کشت سلول می‌توان نتیجه گرفت که پلی‌فنول دالبرجین اثرات افتراقی در زمینه القاء آپوپتوز ایفا می‌کند. نکروز برخلاف آپوپتوز، مرگ بدون برنامه و پاتولوژیک است که در پاسخ به تحریکات قوی ایجاد می‌شود. نکروز توسط عوامل مختلفی نظیر مهار تولید انرژی سلولی (حذف ATP)، عدم تبادل جریان کلسیم سلولی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعال‌سازی پروتئازهای ضد آپوپتوزی القاء می‌شود. دلیل عمده این مرگ، آسیب به غشای سلولی می‌باشد که در بازخورد دوزهای پایین پرتوی یونیزان ایجاد نمی‌شود و مربوط به دوزهای بالا بوده است. نتایج این پروژه نشان داد که پلی‌فنول دالبرجین داروی پیشنهادی برای سلول‌های سرطانی T47D کشت‌داده‌شده در شرایط آزمایشگاهی است و همچنین اثرات حساس‌کنندگی پرتویی پلی‌فنول دالبرجین باعث افزایش میزان آپوپتوز شده است. در نهایت مطالعات بیشتری در جهت شناخت بهتر مکانیسم‌های سلولی و بیوشیمیایی پرتوی یونیزان اشعه ایکس به‌تنهایی و نیز در ترکیب با دیگر روش‌های درمانی در جهت کاربرد این درمان ترکیبی مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی افرادی که در انجام این پژوهش کمک کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

- Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. *The Journal of pathology*. 2011; 223(2): 308-18.
- Peekhaus NT, Chang T, Hayes EC, Wilkinson HA, Mitra SW, Schaeffer JM, Rohrer SP. Distinct effects of the antiestrogen Faslodex on the stability of estrogen receptors-alpha and-beta in the breast cancer cell line MCF-7. *Journal of molecular endocrinology*. 2004; 32(3): 987-95.
- Grimaldi AM, Cassidy PB, Leachmann S, Ascierto PA. *Novel Approaches in Melanoma Prevention and Therapy*, 2014; 443-55. doi:10.1007/978-3-642-38007-5_25
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004; 79(5): 727-47.
- Bokyung sung, SP. Cancer and diet: How are they related? *Free Radical Research*, 2011; 45(8): 864-79.
- Li SR, Chen LY, Tsai JC, Tzeng JY, Tsai IL, Wang EC. New syntheses of dalbergichromene and dalbergin from vanillin via neoflavene intermediate. *Tetrahedron letters*. 2007; 48(12): 2139-41.
- Chatterjee A, Ganguly D, Sen R. New synthesis of 4-phenyl coumarins: dalbergin and nordalbergin. *Tetrahedron*. 1976; 32(20): 2407-8.
- 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.
- Fresco P, Borges F, Diniz MPMM and C. The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 114- 34. doi:http://dx.doi.org/10.2174/138161210789941856.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011; 50(3): 586-621.
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2(12): 1231-46.
- Kong W, Sun R, GAO Y, Nan G, Yang G, Li Y. Dissociation Constants and Solubilities of Dalbergin and Nordalbergin in Different Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2015; 60(9): 2585-93.
- Bhattacharya M, Singh A, Ramrakhyani C. *Dalbergia sissoo*-An Important Medical Plant. *Journal of Medicinal Plants*. 2014; 2(2).
- Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and Oncology*. 2002; 64(3): 259-73.
- Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, Pisansky TM, Martenson J, Komaki R, Okawara G, Rosenthal SA, Kelsen DP. INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy. *Journal of clinical oncology*. 2002; 20(5): 1167-74.
- Khoram NM, Bigdeli B, Nikoofar A, Goliaei B. Caffeic acid phenethyl ester increases radiosensitivity of estrogen receptor-positive and-negative breast cancer cells by prolonging radiation-induced DNA damage. *Journal of breast cancer*. 2016; 19(1): 18-25.
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011; 12(6): 385.
- Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6(6): 472.
- Jang JH, Surh YJ. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochemical pharmacology*. 2003; 66(8): 1371-9.
- Steel GG, Adams GE, Horwich A. *The biological basis of radiotherapy* 1989.
- 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.
- Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC biotechnology*. 2005; 5(1): 12.
- Upadhyay S, Neburi M, Chinni SR, Alhasan S, Miller F, Sarkar FH. Differential sensitivity of normal and malignant breast epithelial cells to genistein is partly mediated by p21WAF1. *Clinical cancer research*. 2001; 7(6): 1782.
- Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The oncologist*. 2006; 11(4): 342-57.