

مطالعه اثر درمان ترکیبی اسانس زنیان و لیزر کم توان بر بقاء سلولی

سلول های سرطان سینه رده MDA-MB-231

خلاصه

مقدمه: سرطان در بسیاری از جوامع از جمله ایران دومین عامل مرگ و میر بعد از بیماری های قلبی عروقی است. یکی از روش های سنتی برای کنترل پیشرفت بیماری سرطان سینه شیمی درمانی است که اغلب با عوارض شدید همراه می باشد. تحقیقات نشان می دهد که گیاهان دارویی منبع عالی و قابل اعتماد برای توسعه داروهای جدید ضد سرطان می باشند. در مطالعه حاضر اثر اسانس گیاه زنیان به تنهایی و همراه با لیزر کم توان بر سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 بررسی شده است.

روش بررسی: پس از کشت سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 این سلول ها با غلظت های مختلف اسانس زنیان (صفر تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و سپس در معرض تابش لیزر کم توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی ۳ J/cm² به مدت ۹۰ ثانیه قرار گرفتند. اثر اسانس زنیان و لیزر کم توان بر بقاء سلولی، تغییرات مورفولوژی سلول ها و وقوع آپوپتوز به ترتیب با استفاده از تست MTT، میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ فلورسانس بررسی گردید.

یافته ها: غلظت مؤثره (IC₅₀) اسانس زنیان در ۳۵ µg/ml در سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 به دست آمد. داده های حاصل از تست MTT نشان داد که سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 در معرض تابش لیزر کم توان تنها از بین نمی روند و همچنین درمان ترکیبی یعنی وقتی ابتدا سلول ها با اسانس زنیان تیمار و سپس در معرض لیزر کم توان قرار داده شدند، نسبت به تیمار با اسانس زنیان تنها، مرگ و میر بیشتری ایجاد می کند. تصاویر حاصل از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ فلورسانس نیز مؤید مرگ و میر سلولی بیشتر در روش ترکیبی تیمار سلول ها با اسانس زنیان و سپس لیزر کم توان بود.

بحث و نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد اسانس زنیان علاوه بر خواص دارویی متعددی که در سایر مطالعات ذکر شده است، دارای اثرات ضد سرطانی نیز می باشد و همچنین درمان ترکیبی متشکل از اسانس زنیان و لیزر کم توان باعث افزایش اثرات ضد سرطانی اسانس زنیان و کاهش بیشتر بقاء سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 می شود. بررسی اثرات ضد سرطانی اسانس زنیان و نیز مواد مؤثره آن در سایر سلول های سرطانی و نیز مدل حیوانی توموری در مطالعات آینده پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: سلول های سرطانی سینه، اسانس زنیان، لیزر کم توان درمانی (LLLT)، آپوپتوز

سپیده ذریعه^۱

زهرا کیان مهر^{۱*}

خاطره خرسندی^{۲*}

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. گروه پژوهشی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسندگان مسئول:
خاطره خرسندی، زهرا کیان مهر

پست الکترونیک:

khorsandi.kh@ut.ac.ir
z.kianmehr@ut.ac.ir

۰۲۱-۶۶۴۴۸۶۲

شماره تماس:

۱. مقدمه

سرطان به معنی رشد، تکثیر و گاهی انتشار غیرطبیعی سلول‌های بدن است. سرطان به دنبال تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها به وجود می‌آید که نتیجه اثر عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی است. چهار دسته از ژن‌های کلیدی که در هدایت سلول‌های سرطانی نقش دارند شامل آنکوژن‌ها، ژن‌های مهارکننده توموری، ژن‌های ترمیم‌کننده DNA و ژن‌های مرگ برنامه‌ریزی شده هستند. چنانچه يك جهش ژنتیکی مهم و با معنی در سلول تولید شود و ترمیم نشود، سلول‌های طبیعی از مسیر خود خارج می‌شوند و تحت تأثیر فرمانده‌های جدید قرار می‌گیرند که به سوی سلول‌های سرطانی شدن پیشرفت می‌کنند [۱].

سرطان پستان بیماری است که در آن سلول‌های بدخیم از بافت سینه منشأ می‌گیرند، به طور نامنظم و فزاینده‌ای تکثیر می‌یابند و بدون این که موجب عکس‌العمل تدافعی و تهاجمی در سیستم ایمنی بدن شوند، از سیستم ایمنی و دفاعی بدن عبور می‌کنند. سرطان سینه اکثر اوقات به صورت یک توده بدون درد و سفت در قسمت فوقانی و خارجی سینه شروع می‌شود و به طور کلی می‌تواند در هر جایی از سینه ایجاد گردد. خطر ابتلا به سرطان سینه با افزایش سن افزایش می‌یابد به عنوان مثال خطر ابتلا به این بیماری بعد از سن ۴۰ و ۵۰ سالگی بیشتر است. سرطان سینه از شایع‌ترین سرطان‌ها (نرخ بروز ۱/۲ میلیون در سال، شایع‌ترین بدخیمی و ۲۳ درصد تمام سرطان‌ها در زنان سراسر جهان) و پنجمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان ایرانی گزارش شده است [۲]. روش‌های مختلفی برای درمان سرطان سینه وجود دارد که عبارتند از: جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، ایمونودرمانی، ژن‌درمانی و حتی تلفیقی از این روش‌ها. یکی از روش‌هایی که به طور سنتی برای کنترل پیشرفت بیماری سرطان سینه استفاده می‌شود، شیمی‌درمانی است [۳ و ۴]. شیمی‌درمانی با وجود داشتن محدودیت‌هایی مانند عدم انتخابی بودن سمیت و هدفمند نبودن داروهای آن، نیازمند بودن به دوزهای بالای دارو برای مبارزه با سلول‌های سرطانی، مقاومت دارویی و عوارض جانبی متعدد، هنوز هم یکی از روش‌های درمانی مؤثر در نبرد با سلول‌های سرطانی به شمار می‌آیند [۵].

یکی از راهکارهای مورد توجه پژوهشگران به عنوان جایگزین شیمی‌درمانی استفاده از ترکیبات استخراج‌شده از گیاهان است. در سال‌های اخیر نقش ترکیب‌های طبیعی موجود در رژیم غذایی به ویژه فلاونوئیدها در مهار سرطان‌زایی و درمان سرطان مورد توجه

بسیاری از محققان قرار گرفته است [۶ و ۷]. در مطالعات نشان داده شده است که گیاهان دارویی منبع عالی و قابل اعتماد برای توسعه داروهای جدید ضدسرطان می‌باشند. اسانس‌ها مخلوطی از ترکیبات روغنی فرار می‌باشند که به عنوان یک متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی ساخته می‌شوند. براساس نظریه سازمان استانداردسازی بین‌المللی، اسانس‌ها به عنوان محصولات استخراجی از منابع گیاهی یا میوه‌جات با استفاده از روش تقطیر با بخار یا آب در نظر گرفته می‌شوند. اسانس‌ها به دلیل ویژگی ضد میکروبی، ضد اکسیدانی، ضد التهابی و ضدسرطان می‌توانند کاربردهای متعددی در زمینه‌های غذایی و دارویی داشته باشند.

گیاه زنیان یا نانخواه با نام علمی *Trachyspermum ammi* L از تیره چتریان (Apiaceae) است و دارای اسامی انگلیسی چون Carum, Lovagel, Ajowan و می‌باشد (شکل ۱). مطالعات فیتوشیمیایی عصاره اتانولی زنیان حضور فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، کربوهیدرات‌ها، فنل‌ها، تانن‌ها و ترپن‌ها را نشان داده است [۸ و ۹]. در مطالعات دارویی مختلف خواص ضد التهابی [۱۰ و ۱۱]، آنتی اکسیدان [۱۸-۱۲] و ضدباکتریایی [۱۹ و ۲۰] و ضدآکنه [۲۱] میوه گیاه زنیان تأیید شده است. مطالعه حاضر بر روی بررسی اثرات ضدسرطانی اسانس زنیان متمرکز شده است.



شکل ۱: دانه‌های گیاه زنیان

اما، از دیگر روش‌هایی که در سال‌های اخیر در زمینه‌های پزشکی مختلف مورد توجه و استفاده قرار گرفته است، لیزر کم توان (LLL, Low Level Laser) است. لیزر کم توان یک نوع خاص از لیزر است که بر روی سیستم‌های بیولوژیکی اثر می‌گذارد [۲۲]. لیزرهای پزشکی که در لیزر درمانی (Low Level Laser Therapy)

از آب معطر جدا می‌شود. اسانس و عرق به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون ظروف شیشه‌ای کدررنگ نگهداری شد.

۲-۲-۲. آنالیز و شناسایی اجزای اسانس زنیان

برای جداسازی و شناسایی اجزای اسانس زنیان دستگاه گاز کروماتوگرافی با ستون موئین سیلیکا HP-5 (به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر) مجهز به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent 5975C استفاده شد. درصد نسبی هر یک از ترکیبات با توجه به سطح زیر منحنی هر ترکیب در طیف کروماتوگراف گازی (GC) محاسبه گردید. شاخص‌های بازداري (RI) با توجه به زمان بازداري (RT) -n آلکان‌های ۸ تا ۲۵ کربنه (C8-C25) به عنوان استاندارد تعیین شد که بعد از اسانس در شرایط مشابه کروماتوگرافی به دستگاه تزریق شدند. شناسایی اجزای اسانس با استفاده از نرم‌افزار دستگاه GC-MS و پارامتر شاخص بازداري و طیف‌های جرمی و مقایسه آن‌ها با ترکیبات استاندارد گزارش شده در کتابخانه‌های Wiley و NIST (کتابخانه‌های NIST05a و Wiley 7n) صورت گرفت.

۲-۲-۳. آماده‌سازی امولسیون زنیان

از آنجا که اسانس به دست آمده محلول در چربی می‌باشد و پایداری کمی دارد، برای سهولت کار از آن امولسیون تهیه شد که محلول در آب می‌باشد. برای تهیه امولسیون پلی‌سوربات - اسانس روغنی - آب معطر، یک میلی‌لیتر اسانس به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب معطر اضافه شد. سپس پلی‌سوربات ۲۰ (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مخلوط اسانس و آب معطر اضافه گردید و مخلوط در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. در این زمان امولسیون شیری رنگی تشکیل می‌شود. میزان کل فنل در امولسیون اسانس - عرق با استفاده از واکنش فولین - سیوکالتو و گالیک‌اسید به عنوان استاندارد تعیین شد [۲۴] این امولسیون شیری رنگ برای انجام آزمایشات مختلف بعدی استفاده شد.

۲-۳. کشت سلول

سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 در محیط کشت DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۵ درصد CO₂، رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند.

(LLLT) مورد استفاده قرار می‌گیرند، عموماً در بخش نور مرئی (قرمز) و نزدیک مادون قرمز (NIR) طیف نور (۶۰۰ تا ۱۰۷۰ نانومتر) عمل می‌کنند. انتخاب طول موج لیزری به شدت به هدف زیستی وابسته است. به طور کلی، لیزرهایی که در محدوده ۶۰۰-۷۰۰ نانومتر عمل می‌کنند، برای درمان بافت‌های سطحی استفاده می‌شوند. به نظر می‌رسد اثرات درمانی این روش توسط واکنش‌های فتوشیمیایی که باعث تغییر نفوذپذیری غشاء سلولی و به دنبال آن افزایش ساخته شدن mRNA و پرولیفراسیون سلولی می‌شود، حاصل می‌گردد. این لیزرها با بافت وارد واکنش می‌گردند و بدون ایجاد حرارت باعث تحریک یا مهار در سلول می‌شوند. واکنش‌های اولیه لیزرهای کم‌توان در سطح سلولی براساس جذب انرژی نور لیزر توسط مولکول‌های زنجیره تنفسی آغاز می‌شود و سیتوکروم-C اکسیداز یک کروموفور اصلی در پاسخ به لیزر کم‌توان است. تابش نور لیزر کم‌توان بر روی میتوکندری‌های ایزوله شده افزایش پتانسیل الکتروشیمیایی پروتون، افزایش سنتز NADH، سنتز RNA و پروتئین، افزایش مصرف اکسیژن، افزایش پتانسیل غشای میتوکندریایی و در نهایت افزایش سنتز ATP را نشان می‌دهد [۲۳].

با توجه به اهمیت ترکیبات گیاهی در درمان سرطان و همچنین شناخت بهتر اثر لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی در این مطالعه اثر اسانس زنیان به تنهایی و نیز در حضور لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطان سینه انسانی رده MDA-MB-231 بررسی شده است.

۲. روش بررسی

۱-۲. مواد و وسایل آزمایش

سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 از مراکز ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شدند. محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی (FBS) و تریپسین از شرکت Gibco، پودر MTT، اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج از شرکت Sigma و بافر PBS و اتانول ۹۶ درصد از شرکت مرک خریداری شدند.

۲-۲. آماده‌سازی اسانس زنیان

دانه گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi*) از عطاری خریداری شد. اسانس زنیان از ۱۰۰ گرم دانه خشک پودر شده با روش تقطیر به وسیله دستگاه کلونجر (Clevenger) آماده شد. حاصل تقطیر، اسانس روغنی و آب معطر (عرق) است که اسانس روغنی به طور معمول در بالای آب معطر قرار می‌گیرد و از طریق یک قیف دکانتور

۴-۲. تست MTT و اندازه‌گیری بقاء سلول

سنجش بقای سلولی به روش MTT پرکاربردترین روش بررسی تکثیر و بقای سلولی محسوب می‌شود. تست MTT یک روش رنگ‌سنجی برای ارزیابی فعالیت متابولیکی سلول مبتنی بر فعالیت میتوکندری می‌باشد. آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز میتوکندریایی وابسته به NAD(P)H تحت شرایط تعریف شده تعداد سلول‌های زنده را منعکس می‌کنند. این آنزیم‌ها باعث احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زردرنگ تترازولیوم یا فرمول شیمیایی MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide به کریستال‌های بنفش - آبی رنگ نامحلول و رسوبی فورمازان می‌شوند. ایزوپروپانول یا دی‌متیل سولفواکسید (DMSO) باعث حل شدن رسوب کروموفور فورمازان می‌شوند. شدت رنگ تولیدشده در طول موج ۵۴۰ تا ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود و به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است. سلول‌های مرده چنین توانایی را ندارند و بنابر این سیگنالی را نشان نمی‌دهند. در این روش تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با فتومتر در یک میکروپلیت انجام می‌شوند. لذا، تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است.

برای انجام آزمایش MTT بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌های تیمار شده، ۵۰ میکرولیتر از محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد ۵ میکرولیتر از محلول استوک MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر بافر نمکی فسفات) به هر چاهک اضافه گردید. پس از چهار ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه، به دنبال خروج محیط کشت رویی، واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO متوقف گردید و میزان جذب، توسط دستگاه الایزایدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله به صورت درصد مقادیر حاصل از کنترل بیان گردید.

۵-۲. بررسی اثر اسانس زنیان به تنهایی و بدون تابش نور لیزر (تاریکی) بر روی سلول‌های سرطانی سینه

برای بررسی اثر اسانس زنیان بر سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 در غیاب تابش نور لیزر در هر چاهک از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی 1×10^4 سلول سرطانی کشت داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از کشت، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از اسانس زنیان شامل صفر تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی انکوبه شدند. سپس میزان مرگ‌ومیر سلولی با استفاده از تست MTT بررسی شد. IC50

یعنی غلظتی از اسانس زنیان که در حضور آن ۵۰ درصد رشد سلول‌ها در مقایسه با کنترل مهار شده باشد، با رسم نمودار درصد بقاء سلولی علیه غلظت‌های مختلف اسانس زنیان محاسبه شد.

۶-۲. بررسی اثر درمان ترکیبی اسانس زنیان و تابش لیزر کم‌توان بر روی سلول‌های سرطانی سینه

در این آزمایش ۲۴ ساعت بعد از کاشت سلولی در دو پلیت ۹۶ خانه، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف اسانس زنیان (صفر تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به صورت سه بار تکرار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. یک پلیت به عنوان کنترل (تاریکی) در نظر گرفته شد و پلیت دیگر تحت تابش لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی $3 J/cm^2$ به مدت ۹۰ ثانیه قرار گرفت و سپس مجدداً در انکوباتور قرار داده شد. جهت اندازه‌گیری بقاء سلولی در هر دو پلیت، تست MTT انجام شد.

۷-۲. مشاهده تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها با میکروسکوپ نوری پس از تیمار سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 با اسانس زنیان به تنهایی یا همراه با تابش لیزر کم‌توان مانند آزمایش فوق، تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها با میکروسکوپ نوری اینورت و بزرگ‌نمایی 40X مورد مطالعه قرار گرفت.

۸-۲. بررسی وقوع آپوپتوز با میکروسکوپ فلورسانس (رنگ آمیزی دوگانه اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج)

در این تست از رنگ‌های فلورسانس آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید استفاده می‌شود. آکریدین اورنج پس از جذب وارد DNA سلول زنده می‌شود و در زیر میکروسکوپ یک نمای سبز رنگ به کروماتین سلول می‌دهد. اتیدیوم بروماید فقط وارد DNA سلول مرده می‌شود و در زیر میکروسکوپ فلورسانس به کروماتین سلول مرده رنگ نارنجی می‌دهد. در نتیجه با استفاده از این روش سلول‌های زنده سبز رنگ و سلول‌های مرده به رنگ نارنجی تا قهوه‌ای دیده می‌شوند.

برای این رنگ آمیزی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آکریدین اورنج را به همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید به نسبت مساوی در ۱ میلی لیتر محلول بافر سالین حل شدند و سپس ۵ میکرولیتر از محلول فوق با ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل از سلول‌های تیمار شده در شرایط مختلف مخلوط کرده و از این مخلوط ۱۰ میکرولیتر روی لام تمیز ریخته و روی آن با لام پوشانده شد. سپس با عدسی 40X میکروسکوپ فلورسانس، سلول‌ها از نظر زنده بودن و غیرزنده بودن بررسی شدند.

۲-۹. آنالیز آماری

تمامی داده‌های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بودند و داده‌ها با Microsoft Excel 2019 و آزمون آماری Student-t-test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و داده‌های با ارزش $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شدند.

۳- یافته‌ها

۳-۱. نتایج آنالیز اسانس زنیان

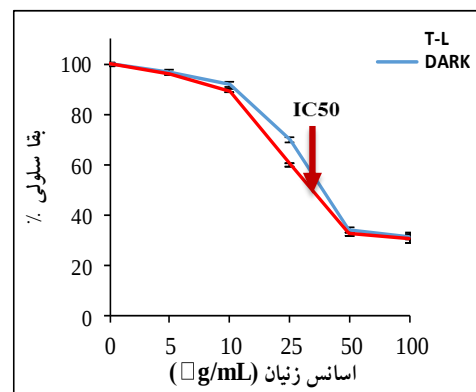
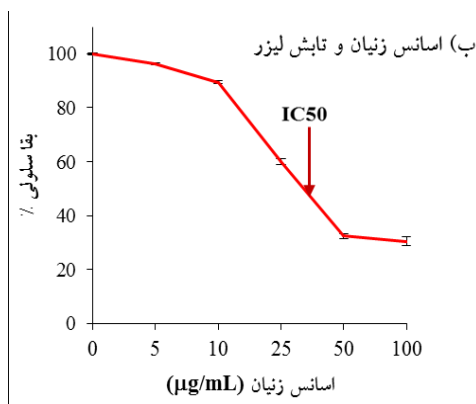
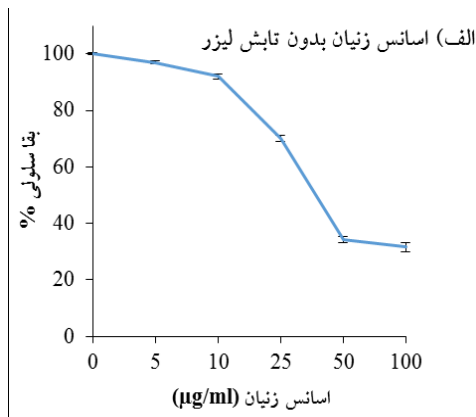
اسانس روغنی متمایل به زرد دانه زنیان با استفاده از دستگاه کلونجر و روش تقطیر (hydro-distillation) آماده شد. نتایج آنالیز ترکیب شیمیایی اسانس زنیان توسط GC-MS حاکی از وجود ۲۳ ترکیب در اسانس زنیان بود که از این میان، اجزای اصلی تشکیل دهنده شامل تیمول (۴۰/۲۵ درصد)، ۷-ترپنین (۳۸/۶۸ درصد) و پاراسیمین (۱۵/۸۴ درصد) بودند.

۳-۲. بررسی تأثیر اسانس زنیان بر بقای سلول‌های سرطانی سینه در تاریکی

نتایج حاصل از این آزمایش که بررسی اثر اسانس زنیان بر سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در تاریکی می‌باشد، نشان داد که در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر از اسانس زنیان در تاریکی درصد بقاء سلول‌ها به ترتیب ۹۷، ۹۲، ۷۰، ۳۴/۳ و ۳۱/۰۶ درصد کاهش می‌یابد که بیانگر این است که با افزایش غلظت اسانس زنیان درصد بقاء سلول کاهش می‌یابد (شکل ۲ الف). غلظت IC50 اسانس زنیان ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

۳-۳. بررسی تأثیر تیمار با اسانس زنیان سپس تابش لیزر کم توان بر سلول‌های سرطانی سینه

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که درصد بقاء سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر از اسانس زنیان و سپس تابش لیزر کم توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر به مدت ۹۰ ثانیه، به ترتیب ۱۰۰، ۹۶/۲، ۸۹/۴، ۶۰، ۳۲/۴۳، ۳۰/۵ درصد کاهش می‌یابد (شکل ۲ ب). بیانگر این است که با افزایش غلظت اسانس زنیان و تابش لیزر کم توان درصد بقای سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد. در نمودار سوم مقایسه بین دو حالت تاریکی و اول تیمار با اسانس زنیان و سپس تابش لیزر کم توان نشان داده است.



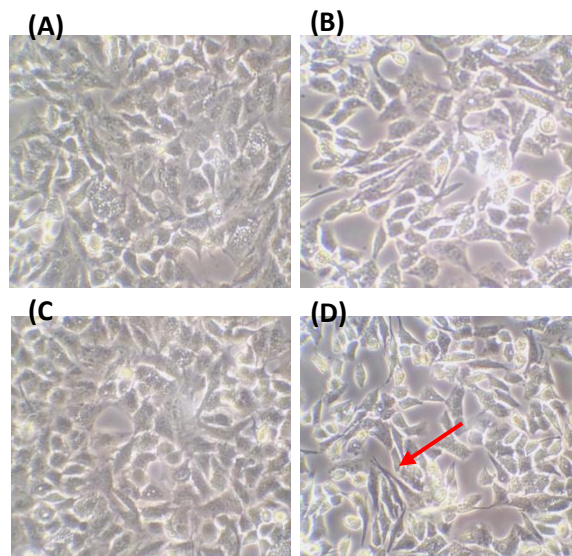
شکل ۲: الف) اثر تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس زنیان به تنهایی بر سلول‌های سرطانی سینه در تاریکی و ب) اثر تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و تابش لیزر کم توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی ۳ J/cm² بر سلول‌های سرطانی سینه. نتایج به صورت میانگین $\pm$ SD (n = 3) نشان داده شده است. * به معنای $P < 0/05$ و معنی‌دار نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) تلقی می‌شود.

۳-۵. بررسی وقوع آپتوز با میکروسکوپ فلورسانس و رنگ آمیزی دوگانه اتیدیوم بروماید و اکریدین اورنج به منظور بررسی القای آپتوز در سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 تیمار شده با اسانس زنیان، لیزر کم توان و درمان ترکیبی با اسانس زنیان و لیزر کم توان از روش رنگ آمیزی دوگانه اکریدین اورنج - اتیدیوم بروماید استفاده شد. اکریدین اورنج توسط سلول‌های زنده و نرمال که غشای آن‌ها سالم است، جذب می‌شود و هنگامی که به DNA دو رشته وصل می‌شود، رنگ فلورسانس سبز را ساطع می‌کند. اتیدیوم بروماید توسط سلول‌هایی که در آن‌ها آپتوز رخ داده و غشای آن‌ها آسیب دیده است، جذب می‌شود و هنگامی که به قطعات متراکم DNA یا اجسام آپتوزی وصل می‌شود، رنگ فلورسانس نارنجی - قرمز را ساطع می‌کند [۲۵].

شکل ۴ تصاویر فلورسنت مربوط به سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 در حالات مختلف از جمله در عدم حضور اسانس زنیان به عنوان کنترل (A)، تیمار شده با غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس زنیان در تاریکی (B)، تیمار شده با تابش لیزر کم توان به مدت ۹۰ ثانیه (C) و تیمار شده با غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس زنیان و سپس تیمار با لیزر کم توان با انرژی ۳ J/cm² (D) را پس از رنگ آمیزی با اکریدین اورنج - اتیدیوم بروماید نشان می‌دهد. همان‌طور که شکل ۴ A- و C نشان داده است، هیچ‌گونه خصوصیات آپتوزی قابل توجهی در سلول‌های کنترل منفی مشاهده نشد در حالی که سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با اسانس زنیان به تنهایی و نیز اسانس زنیان همراه با تابش لیزر کم توان، آپتوز (پیکان قرمز) را نشان می‌دهند (شکل‌های ۴ B- و ۴ D-). با این حال، تعداد سلول‌های آپتوزی در سلول‌های تیمار شده با اسانس زنیان همراه با تابش لیزر کم توان بیشتر از تعداد سلول‌های آپتوزی القاء شده توسط اسانس زنیان به تنهایی بود.

۳-۴. بررسی اثر اسانس زنیان و لیزر کم توان بر مورفولوژی سلول‌های سرطانی سینه با استفاده از میکروسکوپ نوری مورفولوژی سلول‌های سرطانی سینه در حالات مختلف از جمله غلظت صفر و تاریکی (شکل ۳، قسمت A) و غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس زنیان و تاریکی (شکل ۳، قسمت B) و تابش لیزر کم توان به مدت ۹۰ ثانیه و انرژی ۳ J/cm² (شکل ۳، قسمت C) و تیمار سلول‌ها با غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس زنیان و تابش لیزر کم توان با انرژی ۳ J/cm² به مدت ۲۴ ساعت (شکل ۳، قسمت D) با میکروسکوپ اینورت نوری و بزرگنمایی 40X مورد مطالعه قرار گرفتند.

مقایسه تصاویر به دست آمده بیانگر این است که بیشترین تغییر مورفولوژی در سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 در حالت تیمار سلول‌ها با غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس زنیان و تابش لیزر کم توان با انرژی ۳ J/cm² (شکل ۳، قسمت D) اتفاق افتاده است به صورتی که سلول‌ها از حالت دوکی شکل و چسبیده به حالت گرد و از کف پلیت جدا شده تغییر شکل داده‌اند



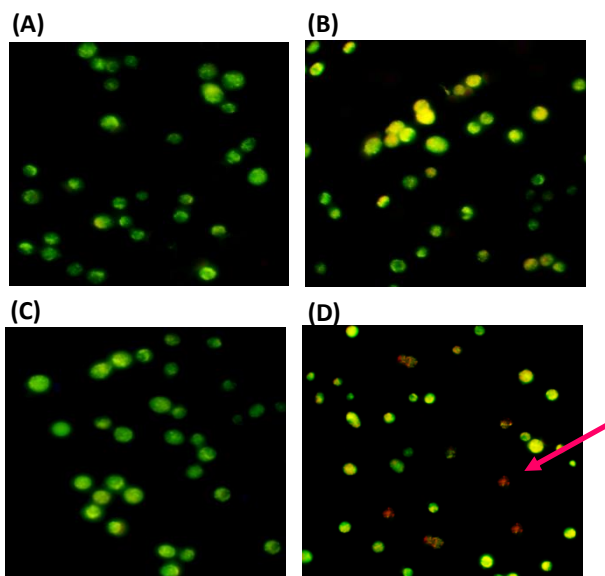
شکل ۳: مورفولوژی سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 در تاریکی و عدم حضور اسانس زنیان (A) و تیمار با ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس زنیان در تاریکی (B)، تابش لیزر کم توان با انرژی ۳ J/cm² به مدت ۹۰ ثانیه (C) و درمان ترکیبی، تیمار سلول‌ها با غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و سپس تابش لیزر کم توان با انرژی ۳ J/cm² به مدت ۹۰ ثانیه (D)

زنیان (*Trachyspermum ammi*)، یکی از گیاهان دارویی مهم است که دارای خواص دارویی بیشماری از قبیل کاهش دهنده کلسترول خون، مؤثر بر فعالیت آنزیم‌های هضم کننده پانکراس و روده کوچک، ضد عفونت‌های قارچی، پاک کننده جریان خون، آرام بخش و درمان درد کلیه می باشد [۱۵، ۱۹ و ۲۰]. هرچند مطالعات متعددی در مورد شناسایی اجزای تشکیل دهنده اسانس زنیان و نیز بررسی خواص ضد میکروبی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی اسانس زنیان انجام شده است، اما مطالعات اندکی در مورد بررسی اثرات ضد سرطانی محصولات بر پایه این گیاه دارویی ارزشمند وجود دارد. از جمله این مطالعات می توان به این موارد اشاره کرد:

Dhivya و همکاران، اثرات سمیت عصاره آبی بذر خشک زنیان در سلول‌های سرطان پستان را بررسی کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پروليفراسیون سلولی وابسته به دوز این عصاره در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. در صورتی که در غلظت‌های زیر ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اثر مهارکنندگی نسبی روی سلول‌ها دیده شد. این مطالعه نشان داد که عصاره آبی بذر خشک زنیان سمیت نسبی و کمی، روی سلول‌های سرطانی دارد و حتی در برخی از غلظت‌ها باعث پروليفراسیون و تکثیر سلول‌های سرطانی می شود [۲۸].

Vitali و همکاران اثرات بیولوژیکی متنوع اسانس دانه زنیان را بررسی کردند و نشان دادند که تیمول (۶۷/۴٪)، پاراسیمن (۱۷/۹٪) و تری پنن (۱۱/۳٪) اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس زنیان هستند و نیز اسانس زنیان دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی می باشد. همچنین نتایج تست MTT به دنبال تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس زنیان (۰/۷۸ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۷۲ ساعت در سه رده سلول سرطانی ملانوما (A375)، آدنوکارسینومای پستان (MDA-MB 231) و سرطان روده بزرگ (HCT116) نشان داد اسانس زنیان دارای اثرات ضد سرطانی است و IC50 آن به ترتیب ۱۶/۹۳، ۶۶/۵۲ و ۹/۶ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد [۲۹].

از سویی دیگر طبق پژوهش‌های قبلی مشخص شده است که لیزر کم توان به عنوان یک درمان چند منظوره ایمن و مؤثر به طور بالقوه برای استفاده با سایر درمان‌ها یا به عنوان یک روش مستقل در درمان سرطان و دیگر بیماری‌های پیچیده می تواند مورد استفاده قرار گیرد. لیزر به واسطه تأثیر بر روی کروموفورهای موجود در میتوکندری،



شکل ۴: تصاویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 (A) عدم حضور اسانس زنیان در تاریکی، (B) حضور ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر از اسانس زنیان در تاریکی، (C) تابش لیزر کم توان و (D) حضور غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر اسانس زنیان و سپس تیمار با لیزر کم توان

۴- بحث و نتیجه گیری

با بالا رفتن پایدار نرخ رشد و پیری، آمار سرطان به طور پیوسته در حال افزایش است و امروزه یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر در جهان مربوط به همین بیماری است [۲۶]. سرطان سینه، دومین علت رایج مرگ ناشی از سرطان است. سرطان سینه یک بیماری به شدت ناهمگن است که در اثر تأثیر متقابل عامل‌های خطر وراثتی و محیطی ایجاد می شود و به تجمع پیش رونده تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلول‌های سرطان سینه منجر می شود. اگرچه شواهد اپیدمیولوژیک بر وجود عامل‌های خطر ویژه (مانند سن، چاقی، مصرف الکل و برخورد با استروژن در طول زندگی) تأکید دارد، وجود سابقه خانوادگی سرطان سینه قوی ترین عامل خطر برای این بیماری به شمار می آید [۲۷].

فرآورده‌های بر پایه گیاهان، دارای پتانسیل بالایی برای ساخت ترکیبات دارویی می باشند. بسیاری از داروهای ضد سرطانی ساخته شده از جمله تاکسان‌ها، وینکا آلکالوئیدها، پودوفیلوتوکسین‌ها و کامپتوتسین‌ها و ... از ترکیبات موجود در گیاهان ساخته شده‌اند و در درمان سرطان‌های مختلف متاستاتیک و غیر متاستاتیک مورد استفاده قرار می گیرند.

تشکیل دهنده اسانس مورد استفاده باشد. آب و هوا و ارتفاع (تنوع جغرافیایی)، گونه، تفاوت مرحله رشد، زمان جمع آوری (تنوع فصلی)، روند آماده سازی اسانس و سایر عوامل ممکن است در ترکیب نهایی اسانس و تفاوت درصد اجزای تشکیل دهنده اسانس تأثیر بگذارند. بنابراین، اسانس به دست آمده از گیاه زنجان که در مناطق مختلف کشورها کشت می شود، از نظر رنگ و طعم، ویسکوزیته و ترکیبات شیمیایی متفاوت می باشد.

همچنین پیش تیمار سلول های MDA-MB-231 با غلظت مشخصی از اسانس زنجان و سپس تیمار این سلول ها با لیزر کم توان، نسبت به حضور اسانس زنجان به تنهایی (تاریکی) بقاء و رشد سلول های سرطانی سینه را بیشتر کاهش داده است. بررسی تغییرات مورفولوژی با میکروسکوپ نوری و بررسی القای آپوپتوز با میکروسکوپ فلورسانس در حالات مختلف آزمایش، مؤید کاهش بیشتر بقای سلولی در حالت تیمار با اسانس زنجان به همراه لیزر کم توان بود.

در مطالعه ما نیز مطابق با هر دو مطالعه کیان مهر و همکاران [۳۰] و خرسندی و همکاران [۳۱] مشخص شد که هرچند لیزر کم توان به تنهایی قادر به از بین بردن سلول های سرطانی نیست، اما استفاده از لیزر کم توان می تواند به نوعی نفوذپذیری سلول های سرطانی را نسبت به داروی ضدسرطان بهبود بخشد و در نتیجه اثر ضدسرطانی آن افزایش یابد.

در مجموع نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثر مثبت لیزر کم توان (انرژی دانسته کم) در بهبود نسبی اثرات ضدسرطانی اسانس زنجان (در غلظت کم $IC_{50} = 35 \mu g/ml$) می باشد اما، برای قضاوت بهتر در مورد اثر لیزر کم توان در افزایش اثرات ضدسرطانی اسانس زنجان که ترکیبی از مواد مؤثره مختلف می باشد، می توان پیشنهاد داد که در رده های مختلف سلول های سرطانی اثر درمان ترکیبی اسانس زنجان با لیزر کم توان و نیز اثر تک تک اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس زنجان به تنهایی و همراه با لیزر کم توان و همچنین اثر اسانس بازسازی شده (ترکیب اجزای اصلی در آزمایشگاه با همان درصد موجود در اسانس طبیعی) بررسی شود.

بنابراین به نظر می رسد در صورت بررسی اثرات ضدسرطانی آن ها در آزمایشات بیشتر احتمالاً قابلیت کاربرد در موارد بالینی را خواهد داشت.

تقدیر و تشکر

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

بر سلول اثر می گذارد و محرک مکانیسم های واکنشی متعاقب در سلول می گردد و یا به واسطه تأثیر بر نفوذپذیری غشای سلولی منجر به تغییر در عکس العمل سلول در مقابل یک تیمار بخصوص می گردد.

با توجه به توضیحات فوق، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ضدسرطانی اسانس زنجان به تنهایی و نیز همراه با لیزر کم توان طرح ریزی شد برای یافتن پاسخ این سؤال که آیا استفاده از لیزر کم توان موجب بهبود توانایی ضدسرطانی اسانس زنجان می شود؟ چه آنکه نتایج مطالعات مختلفی که در آن ها اثر درمان ترکیبی مشکل از یک ماده ضدسرطان و لیزر کم توان بررسی شده است، حاکی از اثر مثبت لیزر کم توان در پایین آوردن دوز مؤثر ماده ضد سرطان می باشد از جمله این مطالعات عبارتند از:

در مطالعه کیان مهر و همکاران اثر پاراکوماریک اسید به عنوان ترکیب فنولی در حضور لیزر کم توان بر سلول های سرطانی ملانومای انسانی رده A375 بررسی گردید. نتایج حاصل نشان داد که بقاء سلول های سرطانی نسبت به پاراکوماریک اسید رفتار وابسته به دوز نشان می دهد. همچنین در روش پیش تیمار سلول های A375 با لیزر کم توان و سپس تیمار سلول ها با پاراکوماریک اسید، بقاء و رشد سلول های سرطانی نسبت به گروه تاریکی بیشتر کاهش می یابد [۳۰]. خرسندی و همکاران اثر گالیک اسید به عنوان ترکیب فنولی در حضور لیزر کم توان بر سلول های سرطانی سینه انسانی رده MDA-MB-231 و سلول های سرطانی ملانومای انسانی رده A375 را بررسی کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که بقای سلول های MDA-MB-231 و A375 در حضور گالیک اسید به صورت وابسته به دوز کاهش می یابد. پیش تیمار سلول های MDA-MB-231 و A375 با لیزر کم توان و سپس تیمار با گالیک اسید موجب کاهش چشمگیر بقاء و رشد هر دو رده سلول های سرطانی نسبت به تیمار با گالیک اسید به تنهایی می شود [۳۱].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس دانه زنجان شامل تیمول (۴۰/۲۵ درصد)، γ -ترپنین (۳۸/۶۸ درصد) و پاراسیمن (۱۵/۸۴ درصد) می باشند. بقای سلول های سرطانی سینه انسانی رده MDA-MB-231 در اثر تیمار با اسانس زنجان در یک رفتار وابسته به دوز کاهش می یابد و دوز مؤثره (IC_{50}) اسانس زنجان ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. یعنی در مقایسه با مطالعه Vitali و همکاران که دوز مؤثره اسانس زنجان در سلول های MDA-MB-231 را ۶۶/۵۲ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند، تقریباً نصف می باشد که ممکن است ناشی از تفاوت درصد اجزای

References:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020, CA. Cancer J. Clin. 2020; 70: 7–30. doi:10.3322/caac.21590.
2. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment, JAMA - J. Am. Med. Assoc. 2019; 321: 316. doi:10.1001/jama.2018; 20751.
3. Fisusi FA, Akala EO. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy, Pharm. Nanotechnol. 2019; 7: 3–23. doi:10.2174/2211738507666190122111224.
4. Zeng ZJ, Li JH, Zhang YJ, Zhao ST. Optimal combination of radiotherapy and endocrine drugs in breast cancer treatment, Cancer/Radiothérapie. 2013; 17: 208–14. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.canrad.2013.01.014.
5. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials, Lancet. 2005; 365: 1687–717. doi:10.1016/S0140-6736(05)66544-0.
6. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, Oxid. Med. Cell. Longev. 2009; 2: 270–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835915/.
7. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. INHIBITION OF CARCINOGENESIS BY DIETARY POLYPHENOLIC COMPOUNDS, Annu. Rev. Nutr. 2001; 21: 381–406. doi:10.1146/annurev.nutr.21.1.381.
8. Bairwa R, Rajawat B, Sodha R. Trachyspermum ammi, Pharmacogn. Rev. 2012; 6: 56. doi:10.4103/0973-7847.95871.
9. Dubey S, Kashyap P. Trachyspermum ammi: A Review on its Multidimensional Uses in Indian Folklore Medicines, Res. J. Med. Plant. 2015; 9: 368–74. doi:10.3923/rjmp.2015.368.374.
10. Thangam C, Dhananjayan R. Antiinflammatory potential of the seeds of Carum copticum Linn, Indian J. Pharmacol. 2003; 35: 388–91.
11. Umar S, Asif M, Sajad M, Ansari MM, Hussain U, Ahmad W. Anti-inflammatory and antioxidant activity of Trachyspermum ammi seeds in collagen induced arthritis in rats, Int J Drug Dev Res. 2012; 4: 210–9.
12. Antioxidant Activity of Essential Oil Extracted by SC-CO₂ from Seeds of Trachyspermum ammi, Medicines. 2017; 4: 53. doi:10.3390/medicines4030053.
13. Chatterjee S, Goswami N, Kothari N. Evaluation of antioxidant activity of essential oil from Ajwain (Trachyspermum ammi) seeds, Int. J. Green Pharm. 2013; 7: 140. doi:10.4103/0973-8258.116396.
14. Bajpai VK, Agrawal P. Studies on Phytochemicals, Antioxidant, Free Radical Scavenging and Lipid Peroxidation Inhibitory effects of Trachyspermum ammi seeds, Indian J. Pharm. Educ. Res. 2015; 49: 58–65. doi:10.5530/ijper.49.1.8.
15. Ranjbaran A, Kavooosi G, Mojallal-Tabatabaei Z, Ardestani SK. The antioxidant activity of Trachyspermum ammi essential oil and thymol in murine macrophages, Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019; 20: 101220. doi:10.1016/j.bcab.2019.101220.
16. Saxena SN, Agarwal D, Saxena R, Rathore SS. Analysis of anti-oxidant properties of ajwain (Trachyspermum ammi L) seed extract, Int J Seed Spices. 2012; 2: 550–5.
17. Prashanth MK, Revanasiddappa HD, Rai KML, Raveesha KA, Jayalakshmi B. Antioxidant and antibacterial activity of ajwain seed extract against antibiotic resistant bacteria and activity enhancement by the addition of metal salts, J. Pharm. Res. 2012; 5: 1952–6.
18. Chatterjee S, Goswami N, Bhatnagar P. Estimation of Phenolic Components and in vitro Antioxidant Activity of Fennel (Foeniculum vulgare) and Ajwain (Trachyspermum ammi) seeds, Adv Biores. 2012; 3: 109–18.
19. Sharifi Mood B, Shafeghat M, Metanat M, Saeidi S, Sepehri N. The Inhibitory Effect of Ajowan Essential Oil on Bacterial Growth, Int. J. Infect. 2014; 1. doi:10.17795/iji-19394.
20. Manayi A, Vazirian M, Omidpanah S, Hosseinkhani F, Hasseli A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of Trachyspermum ammi, Planta Med. 2014; 80. doi:10.1055/s-0034-1394937.
21. Talebi Z, Kord Afshari G, Ahmad Nasrollahi S, Firooz A, Ghovvati M, Samadi A. Potential of Trachyspermum ammi (ajwain) gel for treatment of facial acne vulgaris: a pilot study with skin biophysical profile assessment and red fluorescence photography, Res. J. Pharmacogn. 2020; 7: 61–9.

22. Hamblin MR. Photobiomodulation or low-level laser therapy, *J. Biophotonics*. 2016; 9: 1122–4. doi:10.1002/jbio.201670113.
23. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy, *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40: 516–33. doi:10.1007/s10439-011-0454-7.
24. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, *Nat. Protoc.* 2007; 2: 875–7. doi:10.1038/nprot.2007.102.
25. Wu X. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry, *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 2015; 21: 15–20. doi:10.12659/MSMBR.893327.
26. Lee KW, Bode AM, Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention, *Nat. Rev. Cancer.* 2011; 11: 211–8. doi:10.1038/nrc3017.
27. Wang C, Kar S, Lai X, Cai W, Arfuso F, Sethi G. Triple negative breast cancer in Asia: An insider's view, *Cancer Treat. Rev.* 2018; 62: 29–38. doi:10.1016/j.ctrv.2017.10.014.
28. Ramya N, Priyadharshini XX, Prakash R. Anti-cancer activity of *Trachyspermum ammi* against MCF7 cell lines mediates by p53 and Bcl-2 mRNA levels., *J Phytopharm.* 2017; 6: 78–83.
29. Vitali LA, Beghelli D, Biapa Nya PC, Bistoni O, Cappellacci L, Damiano S. Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermum ammi*, *Arab. J. Chem.* 2016; 9: 775–86. doi:10.1016/j.arabjc.2015.06.002.
30. Kianmehr Z, Khorsandi K, Mohammadi M, Hosseinzadeh R. Low-level laser irradiation potentiates anticancer activity of p-coumaric acid against human malignant melanoma cells, *Melanoma Res.* 2020; 30: 136–46. doi:10.1097/CMR.0000000000000603.
31. Khorsandi K, Kianmehr Z, Hosseinmardi Z, Hosseinzadeh R. Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis, *Cancer Cell Int.* 2020; 20: 18. doi:10.1186/s12935-020-1100-y.