لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۹، دورهٔ ۱۷، شمارهٔ ۲، صفحات: ۲۵-۱۶.

مقاله پژوهشی

اثرات پلی‌فنول دالبرجین بـــر تغییرات بیولوژیکی پرتو یونیزان اشعهٔ ایکس برروی ردهٔ سلولی T47D

فرشته مهدی‌زاده ولوجردی [۱]
بهرام گلیایی [۲]
کاظم پریور [۳]
علیرضا نیکوفر [٤]

خلاصه

مقدمه: ســـرطان پستان رایج‌ترین سرطان تشـــخیصی در زنان و عامل اصلی مرگ در آن‌ها اســـت. سرطان پستان حدود یک‌سوم از کل سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد که درصورت تشـــخیص به‌موقع می‌تواند به یکی از سرطان‌های قابل علاج تبدیل گردد. ردهٔ سلولی T47D جزء ردهٔ سلولی کارســـینوم هست که به‌عنوان ردهٔ سلولی با منشأ سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. T47D نمایندهٔ گروهی از ســـلول‌های ســـرطان سینه با ویژگی ER^+ با گیرنده‌های اســـتروژنی α و β و گیرندهٔ پروژســـترون می‌باشـــد. پلی-فنول‌ها احتمالاً مهم‌ترین ترکیبات گیاهی هســـتند که تاکنون شناسایی و مطالعه شـــده‌اند. دالبرجین از نئوفلاونوئیدهای سنتز شـــده است، نئوفلاونوئیدها دارای اثر سیتوتوکسیک هستند که سمیت ویژهٔ توموری دارد. گیاه Dalbergia sisso در ایران با نام گیاه جک یا شیشم نامیده و در مناطق جنوب ایران کشت داده می‌شـــود.. امروزه، درمان ترکیبی توسط پرتو بسیار حائز اهمیت می‌باشد، درمان ترکیبی توســـط پرتو انواع مختلفی دارد یکی از آن موارد استفاده از داروها و پرتوهای درمانی همزمان با مصرف دارو در جهت کاهش انواع بیماری‌های سرطان می‌باشد.

روش بررســـی: در ایـــن پژوهش تأثیـــر داروی دالبرجیـــن برروی ردهٔ ســـلولی T47D به‌وســـیلهٔ غلظت‌ســـنجی، پرتودهی وآپوپتوز بررســـی گردید. سلول‌های ســـرطانی سینه ردهٔ T47D تحـــت تیمار دالبرجین بـــا غلظت‌هـــای ۰/۰۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰و ۳۰ میکرومـــولار قـــرار گرفته‌انـــد. بعد از گذشـــت زمان‌هـــای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ســـاعت، ۱۰۰ میکرولیتر از اســـتوک MTT با غلظت نهایـــی ۰/۰۵ mg/ml در محیط کشـــت در هر چاهک افزوده شـــد. پس از گذشت ســـه ســـاعت از زمان انکوباسیون، رسوب آبی فورمازان مشـــاهده شـــد. در مرحلهٔ بعد، قدرت کلونی‌زایی ســـلول‌ها در حضور پلی‌فنول دالبرجیـــن و پرتو به‌صورت همزمان مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین ردهٔ ســـلولی T47D و با تراکم $20000\ cell/cm^2$ در پلیت‌های ۲۴ چاهکی کشـــت داده شـــدند و بعد از گذشت ۴۸ ســـاعت از زمان کشـــت ســـلول‌های T47D میزان بقاء و آپوپتوز ســـلول‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دســـت‌آمده در محیط آزمایشگاه نشـــان داد که داروی دالبرجین به‌تنهایی یک داروی مؤثر برروی درمان ردهٔ ســـلولی T47D کشت داده شده است که منجر به نابودی

۱. دکتـــری بیوفیزیـــک، گروه زیست‌شناســـی، دانشـــکدهٔ علوم پایه، دانشـــگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. دکتری بیوفیزیک، گروه بیوشـــیمی فیزیک، دانشکدهٔ IBB، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. دکتـــری زیست‌شناســـی ســـلولی و تکوینی جانـــوری، گروه زیست‌شناســـی، دانشـــکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۴. متخصـــص پرتودرمانـــی، گـــروه رادیوتراپی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران،ایران

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

نتیجه‌گیری: ایـــن مطالعه نشـــان داد که درمان ترکیبـــی پرتوهای یونیـــزان و پلی‌فنول دالبرجیـــن به‌عنـــوان درمان ســـرطان ســـلول‌های T47D کشـــت داده شـــده در شـــرایط آزمایشـــگاهی می‌توانـــد بـــه‌کار گرفته شـــود. بنابراین ایـــن دارو مانند ســـایر پلی‌فنول‌های گیاهی می‌باشـــد و با توجه به میزان غلظت کشـــندگی آن اثر پرتویی خود را نشـــان می‌دهد.

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

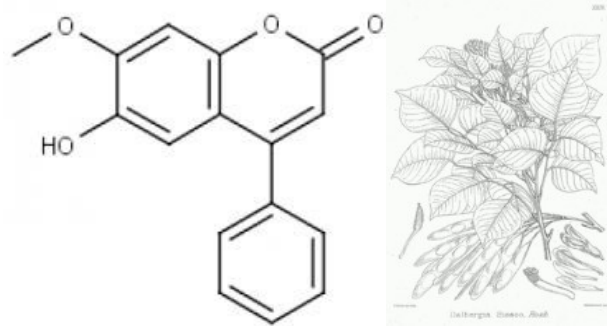
نویســـندهٔ مســـئول: کاظم پریور تلفـــن: ۰۹۱۲۱۳۰۴۵۵۰
پست الکترونیک: kazem_parivar@yahoo.com

مقدمه

سرطان یک بیماری مهلک با آمار مرگ و میر بالا است که درگیری‌های روانـــی و اقتصادی زیادی را به‌دنبال دارد. ســـــرطان در واقع رشـــــد و تکثیر کنترل نشـــدهٔ سلول های غیر طبیعی در بدن می باشد. شایع‌ترین نوع سرطان ســـینه از لحاظ بافت‌شناسی کارســـینوما می‌باشد که شبیه ســـایر نئوپلاســـم‌های اپیتلیالی با تعدادی مراحل پشـــت ســـرهم شامل ناهنجاری گستردهٔ اپیتلیال، هایپرپلازی غیرنرمال کارسینومای در محل و کارسینومای مهاجم مشخص می‌گردد. این تغییرات توسط تعداد زیادی از آزمایشات ژنتیکی و ایمنوهیستوشـــیمی تأیید شده‌است[۱] .سل‌لاین T47D ردهٔ ســـلولی کارســـینوم هســـتند و به‌عنوان ردهٔ سلولی با منشأ ســـرطانی استفاده می‌شـــوند. T47D نمایندهٔ گروهی از سرطان سینه با ویژگی ER^+ که دارای گیرندهای استروژنی α و β و گیرندهٔ پروژسترون می‌باشـــد، هـــر دو دارای زیر گـــروه لومینال A هســـتند و نوع توموری کارسینومای مجاری لنفی مهاجم هســـتند 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 می‌شـــود. این دو سلول وقتی رشـــد می‌کنند شگل گنبدی است و از طرفـــی می‌تواند با فاکتـــور نکروز تومور α (TNFα) و با اســـتفاده از ترکیبات ضداستروژن مانع از رشـــد سلول‌های T47D شود[۲]. درحال حاضر جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی از رایج‌ترین درمان‌های سرطان سینه هســـتند. اما، به‌دلیل عوارض جانبـــی بالینی این درمان‌ها محققان به‌دنبـــال یافتـــن درمان‌های جایگزیـــن، مکمل یا حتـــی ترکیبی که در عین داشـــتن کارآیی بـــالا، عوارض جانبی کمتری نیـــز دارند، می باشـــند. از انواع این درمان‌ها می‌توان به اســـتفاده از ترکیبات گیاهی اشاره کرد که امروزه زمینهٔ تحقیقات وســـیعی ازجمله بررســـی اثرات آنتی‌اکســـیدانی و ضدسرطانی را به‌خود اختصاص داده‌اند[۳]. پلی‌فنول‌ها احتمالاً مهم‌ترین ترکیبات گیاهی هستند که تاکنون شناسایی و مطالعه شـــده‌اند. هزاران مولکول دارای ساختار پلی‌فنولی (گروهای 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 بیمـــاری‌زا و یا خطر حیوانات گیاه‌خوار حفاظـــت می‌کنند. پلی‌فنول‌ها از آمینواسید فنیل‌آلانین مشتق شـــده‌اند و آن‌ها را می‌توان براساس تعداد حلقه‌های فنولی در ساختمانشـــان و یا اجزاء ساختاری که موجب اتصال این حلقه‌ها به یکدیگر می‌شود، طبقه‌بندی کرد. بر این اساس پلی‌فنول‌ها شـــامل چهار گروه فنولیک اســـیدها، فلاونوئیدها، لیگنان‌ها و استیلین‌ها می‌باشـــند، هرکدام از گروه‌های نامبرده با داشـــتن ویژگی‌ها و گروه‌های عاملی متفاوت خود به زیرگروه‌هایی تقسیم‌بندی می‌شود[۴و۵]. دالبرجین از نئوفلاونوئیدها ســـنتز 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 می‌شـــود. یک درخت سرخ مایل به قرمز می‌باشـــد که به‌سرعت در حال رشـــد اســـت. برگ آن مرکب با برگچه‌های قلبی شـــکل اســـت، ارتفاع این گیاه تابیش از ۱۰ متر می‌رســـد. در مناطق بومی ســـاحل شبه قارهٔ هند و جنوب ایران اســـت. جنـــس دالبرجیا از یک گونه به نام سیســـیو (D.Sisso) که در ایران به نام جک یا شیشم معروف است. دالبرجین از 2H-1-Benzopyran-2-one تولید شـــده اســـت. DBN با فرمول شـــیمیایی C16H12O4 بیان می‌شـــود. این گیاه بـــرای درمان انواع خونریزی‌هـــا، دردها، تـــب، درد معده، ســـیفیلیس و ضدمیکروب قارچی

که در طب سنتی استفاده می‌شود. از این گیاه می‌تواند در ساخت ترکیبات دارویی استفاده قرار نمود و همچنین ترکیب دالبرجین خاصیت آنتی‌اکسیدان قوی دارد(شکل ۱)[۶و۷].

پرتودرمانی عبارت است از استفاده از پرتوهای یونیزان جهت کنترل و درمان بافت‌های سرطانی که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌ها در معالجهٔ 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. درصورتی‌که 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 امرگامی بسیار مؤثر در بهبود پدیدهٔ پرتودرمانی محسوب می‌شود. زیرا آسیب‌های ناخواسته به بافت‌های نرمال مجاور در هنگام پرتودرمانی موجب ایجاد محدودیت‌ها در به‌کارگیری دوز درمانی مؤثر و تکمیل دورهٔ 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 اشعهٔ ایکس بر سلول های سرطانی ما را برآن 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 سینهٔ انسانی بررسی کنیم.



شکل۱: 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.

روش بررسی

مواد و وسایل آزمایش

ردهٔ سلولی T47D از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. محیط کشت RPMI از شرکت Gibco (USA)، سرم جنین گوساله (GIBCO USA:10270)، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (Sigma-Alderich USA)، استرپتومایسین (TORGE-Germany و داروسازی جابربن حیان) و سدیم بی‌کربنات (Merck, Germany) استفاده شد. پودر دی‌فنیل-تترازولیوم برماید (Sigma-Alderich USA)، اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج از شرکت (Sigma-Alderich USA) تهیه گردید و همچنین در تمامی آزمایش‌ها از آب مقطر دیونیزه استفاده شد.

کشت و پاساژ سلول

هر دو ردهٔ سلولی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین در ۷۲۰ میلی‌گرم در لیتر و پنی‌سیلین در ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر اضافه شد. تراکم اولیه برای کشت ردهٔ سلولی T47D برابر $۲۰۰۰۰ cell.cm^{-2}$ بوده است. زمانی‌که دانسیتهٔ سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد می‌رسید، سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند.

سنجش MTT

از این آزمون برای سنجش سمیت دارو استفاده می‌شود زیرا ماده‌ای زردرنگ دی متیل تیازول - دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) زمانی‌که به درون سلول وارد شود، زنجیرهٔ تنفسی و سیستم‌های انتقال الکترون و سایر نمک‌های تترازولیوم را احیاء می‌کنند و کریستال‌های فورمازان بنفش‌رنگ نامحلول در سلول تشکیل می‌شود به این منظور، ردهٔ سلولی T47D با تراکم $۲۰۰۰۰ cell.cm^2$، در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شد و در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت سلول‌ها تحت تیمار دالبرجین با غلظت‌های ۰/۰۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰و ۳۰ میکرومولار قرار گرفته‌اند. بعد از گذشت زمان‌های ذکرشده ۱۰۰ میکرولیتر از استوک MTT با غلظت نهایی ۰/۰۵ 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 الایزا ریدر در طول‌موج 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 ردهٔ سلولی T47D با تراکم $۲۰۰۰۰ cell.cm^{-2}$، در پلیت‌های ۲۴ چاهکی کشت داده شدند. بعد از رسیدن سلول‌ها به

تراکم مورد نظر، پلیت‌ها توسط پارافیلم پوشیده شد و همچنین نمونه‌ها با استفاده از یخ به بیمارستان پارس در مدت‌زمان ۱۰ دقیقه جهت پرتودهی منتقل گردیده شد. دستگاه اشعهٔ ایکسی 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 ناحیهٔ پرتودهی، فاصلهٔ منبع تابش تا کف پلیت و دوز مورد نظر به‌صورت سانتی‌گری) از این موارد هستند. درنهایت سلول‌ها تحت دوزهای ۲،۰، ۴، ۶، ۸، ۱۰ گری پرتوی ایکس قرار گرفتند و یک پلیت کنترل به‌همراه سایر پلیت‌ها به اتاق پرتودهی برده شد تا اثر دوز پس‌زمینهٔ محیط خللی در نتیجهٔ 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 مدت‌زمان لازم برای تشکیل کلنی، کلنی‌ها تثبیت و رنگ‌آمیزی شدند.

سلول‌های تیمارشده با دالبرجین و پرتو

توانایی کلنی‌زایی سلول‌ها در درمان ترکیبی مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول T47D با تراکم $۲۰۰۰۰ cell.cm^2$ در پلیت‌ها کشت داده شدند سپس تحت تیمار دالبرجین با غلظت‌های ۰/۰۰۱ میکرومولار قرار گرفته‌اند. محیط کشت سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت تیمار با دالبرجین، با محیط کشت تازه حاوی ۱۰ درصد سرم تعویض شد. به‌منظور پرتودهی، پلیت‌ها با گذر زمان ۱۰ دقیقه به بیمارستان پارس منتقل گردیدند و تحت تابش ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ گری پرتو قرار گرفتند. بعد از آن سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند. تعداد معینی (مطابق جدول۳) در پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری کشت داده شدند. بعد از گذشت مدت‌زمان لازم، کلنی‌ها رنگ‌آمیزی و شمارش شدند و در نهایت راندمان کشت سلولی و کسر بقاء محاسبه گردید.

جدول۱: مشخصات دستگاه اشعهٔ 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

مشاهدهٔ سلول‌های آپوپتوتیک و بررسی کیفی

در این آزمون ۴ گروه مورد بررسی قرار گرفتند:

الف) بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان کشت سلول T47D میزان بقاء و آپوپتوز سلول بررسی شد.

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

ج) سلول‌ها تحت تابش پرتوی اشعهٔ ایکس قرار گرفتند و آپوپتوز آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

د) سلول‌ها تحت تیمار با دالبرجین و پرتوی اشعهٔ ایکس به‌صورت همزمان قرار گرفتند و سپس مقدار رشد و بقای آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته شد.

الف) سلول‌های کشت‌داده‌شده بعد از رسیدن به دانسیتهٔ مورد نظر تریپسینه و از کف پلیت جمع‌آوری شدند، سپس سانتریفوژ شدند (با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت 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 اتیدیوم‌بروماید و آکریدین‌اورنج سوسپانس شد و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های رنگ‌شده روی لام ریخته و لامل برروی آن قرار گرفته شد و سپس توسط میکروسکوپ مستقیم فلورسانس با بزرگ‌نمایی ۴۰ × تحت‌تابش نور آبی تصویربرداری صورت گرفت.

ب) تیمار سلول‌ها با دالبرجین به این صورت عمل شد که سلول T47D تحت تیمار دالبرجین با غلظت‌های ۰/۰۰۱ میکرومولار در مدت‌زمان 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 اتیدیوم‌بروماید و آکریدین‌اورنج سوسپانس شد و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های رنگ‌شده روی لام ریخته و لامل برروی آن قرار داده شد و توسط میکروسکوپ مستقیم فلورسانس با بزرگ‌نمایی ۴۰ × تحت‌تابش نور آبی تصویربرداری گردید.

ج) در این مرحله هر دو ردهٔ سلولی کشت داده شدند و تحت تیمار با اشعهٔ ایکس (دوز ۴ گری) قرارگرفتند 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 و۲ میکرولیتر از مخلوط رنگی آکریدین‌اورنج و اتیدیوم‌بروماید سوسپانس شد و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های رنگ‌شده روی لام ریخته و لامل برروی آن قرار داده شد و توسط میکروسکوپ مستقیم فلوئورسانس با بزرگ‌نمایی ۴۰ × تحت تابش نور آبی تصویربرداری انجام گردید.

د) میزان آپوپتوز ردهٔ سلولی T47D بعد درمان ترکیبی (تابش پرتویی

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 اشعهٔ ایکس (دوز ۴ گری) قرار گرفتند و به‌مدت 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 به‌مدت 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 اتیدیوم‌بروماید سوسپانس شد و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های رنگ‌شده روی لام ریخته و لامل برروی 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 ردهٔ سلولی T47D تحت تیمار با دالبرجین با غلظت‌های نهایی ۰/۰۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰و ۳۰ می‌کرومولار قرار گرفتند. به‌منظور به‌دست‌آوردن بهترین زمان تیمار دالبرجین برروی سلول، زمان‌های تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودار۱ (الف،ب،ج ،د) تیمار ردهٔ T47D در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمایش داده شده است و همچنین نمودار د مقایسهٔ 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 رابطهٔ ۱ درصد بقاء سلول‌های تیمارشده= (میانگین جذب سلول‌های تیمارشده)/(میانگین جذب سلول‌های شاهد)×۱۰۰ محاسبه گردید.

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

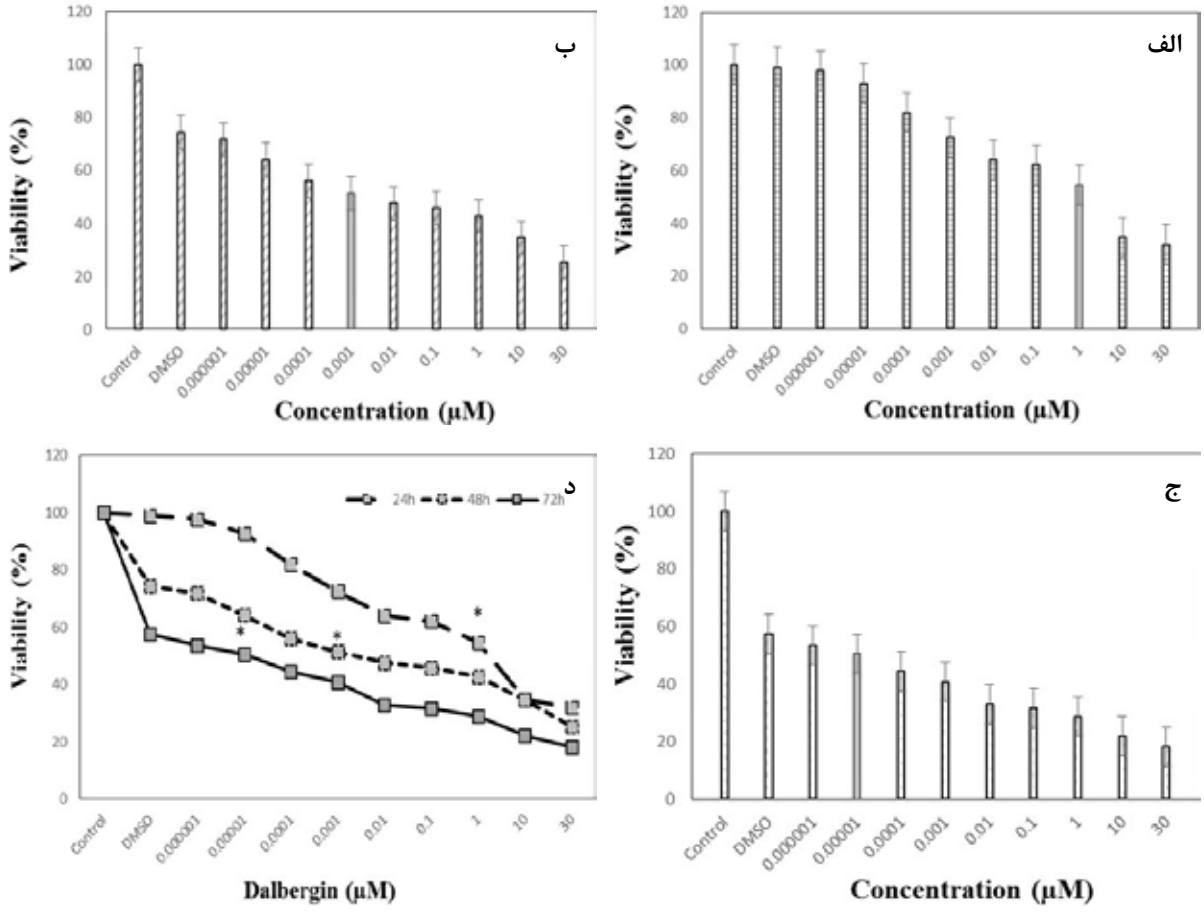
درنمودار ۲ منحنی بقاء ردهٔ سلولی T47D قبل و بعد از درمان ترکیبی نشان داده‌شده‌است. با استفاده از نرم‌افزار مطلب این داده‌ها بر مدل خطی درجه دو منطبق گردید. درصورت مقایسهٔ این نمودارها با زمان قبل از تیمار ترکیبی، منحنی بقاء کاهش بیشتری یافته است و این امر نشان‌دهندهٔ مرگ بیشتر سلول‌ها در مواجهه با پرتو و دالبرجین است و بهترین دوز انتخاب‌شده ۴ گری برای مرحلهٔ سنجش آپوپتوز در سلول‌های T47D انتخاب گردید. در نهایت برای به‌دست‌آوردن کسر بقاء از رابطهٔ زیر استفاده شد. براساس رابطهٔ ۲ کسر بقاء = راندمان کشت نمونهٔ تیمارشده/ راندمان کشت نمونهٔ شاهد محاسبه گردید. جدول ۲ و ۳ به‌ترتیب تعداد سلول‌های کشت‌داده‌شدهٔ T47D برحسب دوزهای مختلف اشعهٔ ایکس و تعداد سلول‌های کشت‌داده‌شدهٔ T47D و (بعد از تیمار با دالبرجین) برحسب دوزهای مختلف اشعهٔ ایکس را نشان می‌دهد و همچنین شکل۲ تصاویر کلنی‌ها را نشان می‌دهد. شکل‌های (الف و ب) به‌ترتیب معرف سلول‌های T47D قبل و بعد از پرتو و تیمار دالبرجین است.

سنجش آپوپتوز در ردهٔ سلولی T47D

از این تست برای شناخت مشخصات ظاهری سلول‌های سالم، آپوپتوزی در مراحل اولیه یا ثانویه و یا نکروزی استفاده شد. هر دو ردهٔ سلولی زمانی‌که در مرحلهٔ قبل آپوپتوز باشند، ظاهری سبزرنگ دارند در زمان تابش پرتویی این سلول‌ها زردرنگ هستند، در هنگام مراحل اولیهٔ 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 جدول۴ و شکل۳)

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به اهمیت ترکیبات فنولی در درمان سرطان و همچنین شناخت پرتوهای یونیزان بر سلول‌های سرطانی، در این مطالعه اثر دالبرجین به‌عنوان ترکیب فنولی در حضور پرتو یونیزان بر بقاء و آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینهٔ انسانی ردهٔ 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 ابتلاء 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: دستهٔ اول فنولیک‌اسید، دستهٔ دوم فلاونوئید (ایزوفلاونوئید، نئوفلاونوئید، چالکون، فلاونز، فلاونول، پروآنتوسیانیدین، آنتوسیانیدین)، دستهٔ سوم پلی‌فنولیک‌اسید و دستهٔ پایانی شامل دیگر پلی‌فنول‌ها می‌باشد. پلی‌فنول دالبرجین از دستهٔ 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 گونهٔ گیاهی تلخ‌بیان می‌باشد. امروزه، ترکیباتی مانند



نمودار۱: درصد سلول‌های زندهٔ ردهٔ سلولی T۴۷D تیمارشده با غلظت‌های ۰/۰۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰و ۳۰ میکرومولار از دالبرجین پس از الف(۲۴)، ب(۴۸)، ج(۷۲) ساعت تیمار از طریق دو نمودار ستونی و خطی گزارش شده است. در قسمت د مقایسهٔ تیمار سه زمان مختلف آورده شده است. نتایج حاصل سه بار تکرار بوده است.* نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

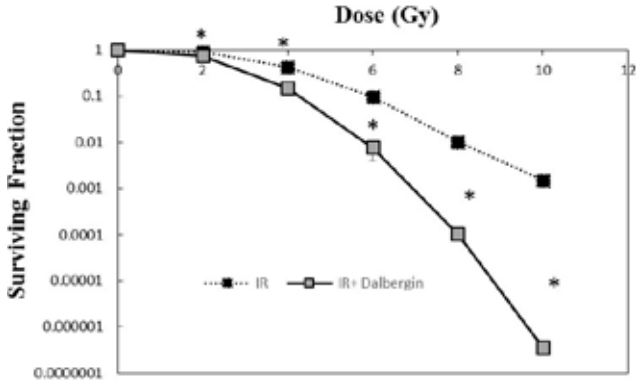
ایزوفلاون‌ها و بیوچنین یافته‌شده عامل پیشگیری شیمی‌درمانی سرطان دارد و همچنین به‌تازگی فعالیت‌های استروژن از گل‌های این گیاه یافت شده است. در سال‌های اخیر، مطالعات دارویی قوی روی این گیاه در حال انجام می‌باشد[۱۳]. این ترکیبات دالبرجین در گیاهان دالبرجیاسیسو در چوب این گیاه بسیار فراوان است. ترکیب دالبرجین 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 درداخل بدن انجام شود (رادیوتراپی سیستمیک). نوع پرتودهی به نوع تومور، تحمل بافت‌های سالم اطراف محل آن، مسافتی که پرتو باید در داخل بدن طی کند همچنین به سلامت عمومی بیمار، تاریخچهٔ بیماری و اینکه آیا بیمار از روش‌های دیگر درمان استفاده خواهد کرد یا نه و مجموعه‌ای عوامل دیگر بستگی دارد. در بیشتر بیماران از روش پرتودرمانی خارجی و در تعدادی از بیماران از سه روش پرتودرمانی خارجی، داخلی، سیستمیک همراه با هم و یا جداگانه استفاده می‌شود. رادیوتراپی یکی از مهم‌ترین روش‌های درمان سرطان می‌باشد، پاسخ پرتوی یونیزان در طول مدیریت درمان تأثیر بسیار کمی روی بافت‌های سالم می‌گذارد و بیشترین تأثیر روی تومور می‌باشد. در حال حاضر مشاهده شده است که

جدول۲: تعداد سلول‌های کشت‌داده‌شدهٔ T۴۷D برحسب دوزهای مختلف اشعهٔ ایکس

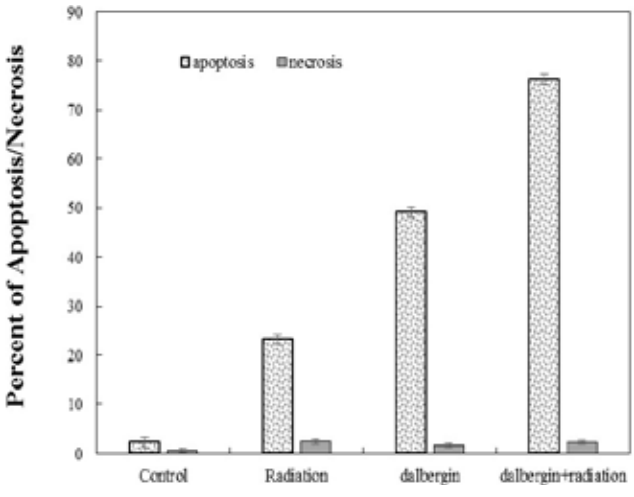
دوز پرتو (گری)	۰	۲	۴	۶	۸	۱۰
ردهٔ سلولی T47D	۵۰۰	۷۵۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰	۸۰۰۰	۱۶۰۰۰

جدول۲: تعداد سلول‌های کشت‌داده‌شدهٔ T۴۷D و (بعد از تیمار با دالبرجین) برحسب دوزهای مختلف اشعهٔ ایکس

دوز پرتو (گری)	۰	۲	۴	۶	۸	۱۰
ردهٔ سلولی T47D	۷۵۰	۱۰۰۰	۴۰۰۰	۶۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۸۰۰۰



نمودار۲: نمودارهای بقاء ردهٔ سلولی T۴۷D برحسب دوزهای مختلف پرتوی یونیزان و تیمار ترکیبی دالبرجین و پرتوی یونیزان ایکس. اختلاف بین منحنی‌های بقاء گروه کنترل وکنترل حلال DMSO به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. نتایج نشان‌دهندهٔ سه بار تکرار است و نمودار حاصل نتایج این سه بار تکرار است. * نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار آماری P<۰/۰۵ میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل مربوطه می‌باشد.



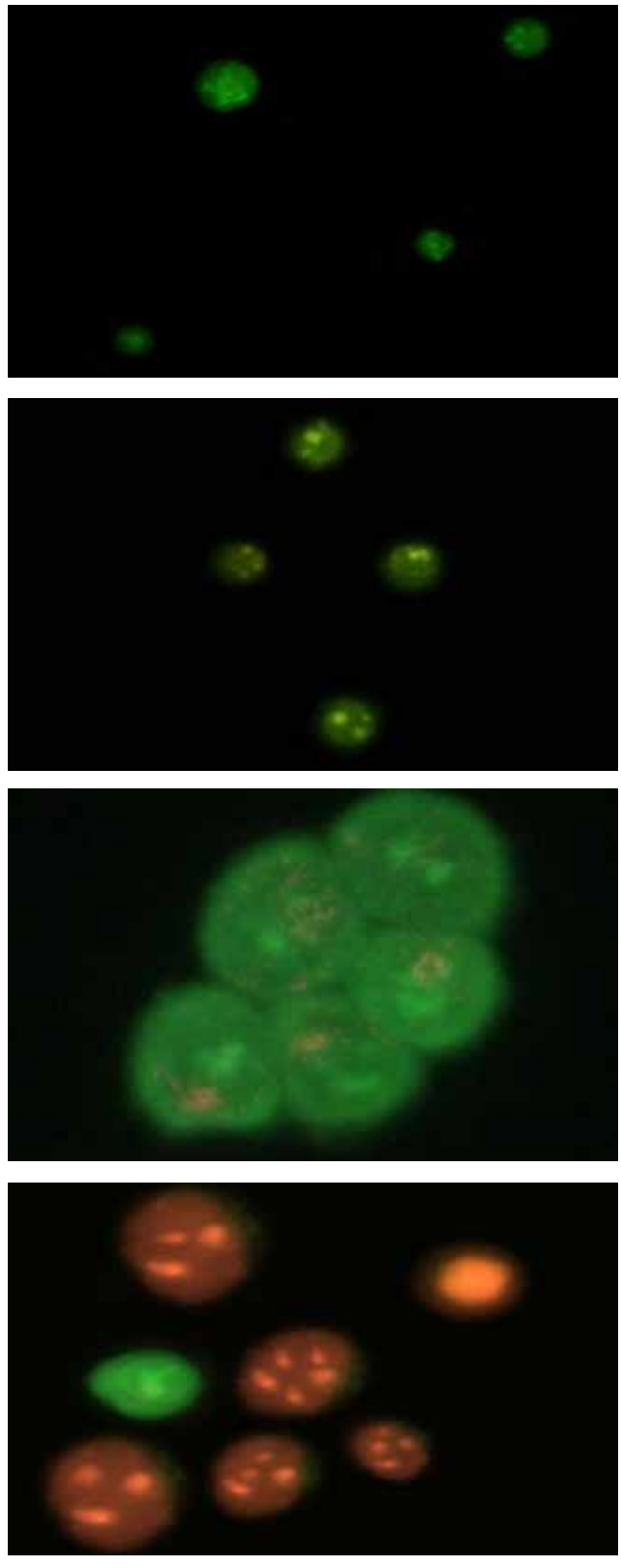
نمودار۳: مقایسهٔ آپوپتوز در نمونه‌های مختلف از کشت T۴۷D است

شـــکل۲: تصاویر کلنی‌ها قبل و بعد از پرتودهی با اشعهٔ ایکس و تیمار ترکیبی دالبرجین و پرتوی یونیزان ایکس

یکی از اســـتراتژی‌های مهم در درمان رادیوتراپی است[۱۵]. برای همین امروزه از درمان‌های ترکیبی اســـتفاده می‌شود و بسیار تأثیر به‌سزایی در روند بهبود بیماری دارد. بنابراین برای بررسی میزان کشندگی دارو برروی ســـلول‌ها از تست MTT استفاده شـــد. دالبرجین که عضو گروه خانوادهٔ نئوفلاونوئیدها اســـت، باعث کاهش بقاء، در رده‌های ســـلولی شده است. منحنی بقاء ردهٔ سلولی T47D بعد از تیمار دالبرجین کاهش یافته است. طبق تحقیقات انجام‌شـــده در سال ۲۰۱۶ این نئوفلاونوئیدها باعث مرگ ســـلول‌های سرطان لوسمی انسانی شده است[۱۶]. می‌توان نتیجه گرفت پلی‌فنول دالبرجین اثرات افتراقی در زمینهٔ ســـمیت، رشد و تکثیر و بقاء سلول‌های سرطان سینهٔ انســـانی T47D ایفا می‌کند. فاجعهٔ میتوزی و پیری ســـلولی از نوع مرگ‌های ناشـــی از پرتو می‌باشد و سلول‌ها توانایی کلنی‌زایی را از دســـت می‌دهند. با این تفاوت که در فاجعهٔ میتوزی فاقد توانایی در نقاط G2 و M می‌باشد و درنتیجهٔ آسیب وارد به DNA بدون ترمیم وارد میتوز می‌شود. درنتیجه سلول‌ها با یک هستهٔ بزرگ یا چندین هســـته‌ای ایجاد می‌شـــود و بعد از دو تا سه تقســـیم دچار مرگ سلولی می‌شـــوند[۱۷]. اما پیری ســـلولی درنتیجهٔ جهش در ژن p53 و افزایش بیان ژن‌های ســـرکوبگر تومور در مرز G1 ایجاد می‌شود. فاز G0 دوره‌ای است که در چرخهٔ سلولی، سلول به‌صورت ساکن باقی می‌ماند و این بدان معنا اســـت که به‌نظر می‌رسد ســـلول در یک فاز طولانی G1 قرار گرفته

جدول۵: درصد آپوپتوز و نکروز برای نمونه‌های کشت T۴۷D

	Apoptosis	Necrosis
Control	۲.۲۵۷۵۳۵۲۶۴	۰.۵۱۱۸۳۷۸۶۸
Radiation	۲۳.۲۴۵۹۸۳۰۶	۲.۳۱۰۵۳۲۹۹۲
Dalbergin	۴۹.۱۶۵۵۶۹۴۸	۱.۶۲۶۴۱۸۷۶۲
Dalbergin+Radiation	۷۶.۳۰۱۹۶۸۳۷	۲.۲۰۴۵۸۰۱۶۸



شکل۲: 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 رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیدم بروماید در زیر میکروسکوپ فلئورسانس با بزرگ‌نمایی۴۰×

است و قابلیت تقسیم ندارد[۱۸]. اثر مشاهده‌شده 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-Value<0.05 ۱۰،۸،۶،۴،۲،۰ گری که نشان‌دهندهٔ 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 القاءکنندهٔ 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 اثرحساس‌کنندگی پرتویی ترکیب با دالبرجین و تفسیر نمودارهای حاصله از منحنی درجه دو استفاده می‌شد. پارامترهای α و β سهم مربوط به دوزهای پایین و بالا است[۲۰]. سلول‌های سرطان سینهٔ انسانی زمانی‌که با پلی‌فنول دالبرجین تیمار شدند و سپس تحت تابش پرتو قرار گرفته‌اند، نسبت به حالتی‌که فقط پرتودهی 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 مشاهدهٔ سلول‌های آپوپتیک و نکروتیک از دو رنگ فلورسانس آکریدین اورنج واتیدیوم بروماید استفاده شد. رنگ آکریدین اورنج یک رنگ کاتیونی است و به‌صورت انتخابی به DNA سلول‌ها از طریق اینترکالیشن متصل می‌گردد و هنگامی‌که به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود یعنی با نور آبی تحریک می‌شود و رنگ سبز با طول‌موج ۵۲۵ نانومتر و زمانی‌که 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. اتیدیوم بروماید سلول‌هایی را رنگ کرده که تمامیت غشای خود را از دست داده‌اند و طول‌موج جذب آن در اتصال به DNA ۵۱۰ نانومتر است درنتیجه سلول‌ها رنگ نارنجی به‌خود می‌گیرند. لازم به ذکر است که وجود نقاط سبز درخشان در هسته نشان‌دهندهٔ متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته است، بیانگر مرحلهٔ اولیهٔ آپوپتوز است. سلول‌ها در مرحلهٔ انتهایی آپوپتوز و یا نکروز تمامیت غشای خود را از دست می‌دهد و درنتیجه رنگ اتیدیوم بروماید وارد سلول و هسته می‌شود و این رنگ تحت تأثیر نور فلورسانس قرمز رنگ دیده می‌شود. سلول‌های نکروزشده 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 ردهٔ سلولی به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. این اختلاف معنی‌داری بین درصد سلول‌های آپوپتوزی در مراحل اولیهٔ سلولی با غلظت ۰/۰۰۱ نسبت به

گروه کنترل وجود دارد. داده‌ها نشان می‌دهد که میزان افزایش درصد سلول‌های آپوپتوزی در ردهٔ سلولی T47D است. در مطالعهٔ دیگری نشان داده شده است که پلی‌فنول جنیستئین توانایی ایجاد حساسیت افتراقی بین سلول‌های بدخیم اپیتلیالی سینهٔ انسان مانند MDA-MB-231 را دارد و باعث القاء آپوپتوز شده‌است[۲۳و۲۴]. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در آزمایشگاه کشت سلول می‌توان نتیجه گرفت که پلی‌فنول دالبرجین اثرات افتراقی در زمینهٔ 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 ضدآپوپتوزی القاء می‌شود. دلیل عمدهٔ 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 اشعهٔ 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:

1. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. The Journal of pathology. 2011; 223(2): 308-18.

2. 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.

3. 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

4. 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.

5. Bokyung sung, SP. Cancer and diet: How are they related? Free Radical Research, 2011; 45(8): 864-79.

6. 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.

7. Chatterjee A, Ganguly D, Sen R. New synthesis of 4-phenyl coumarins: dalbergin and nordalbergin. Tetrahedron. 1976; 32(20): 2407-8.

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.

9. 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.

10. 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.

11. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2010; 2(12): 1231-46.

12. 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.

13. Bhattacharya M, Singh A, Ramrakhyani C. Dalbergia sissoo-An Important Medical Plant. Journal of Medicinal Plants. 2014; 2(2).

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. Nature Reviews Cancer. 2006; 6(6): 472.

18. Jang JH, Surh YJ. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. Biochemical pharmacology. 2003; 66(8): 1371-9.

19. Steel GG, Adams GE, Horwich A. The biological basis of radiotherapy 1989.

20. 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.

21. Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. BMC biotechnology. 2005; 5(1): 12.

22. 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.

23. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. The oncologist. 2006; 11(4): 342-57.