

Evaluation of smoke burning AnbarNesara on changes of the gene expression of P53 and CYP2E1 in human liver cancer cells

Maryam Keikha-Akher¹, Khadije Shahrokhhabadi^{1*}, Javad Baharara²

1.Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2.Research Center for Animal Development Applied Biology & Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

(Received: 2020/01/15

Accept: 2020/08/25)

Abstract

Background and Aims: Cancer is the leading cause of death after cardiovascular diseases, and accidents. Nowadays, researchers are increasing their efforts to use treatments with minimal side effects and make an attempt to use traditional medicine and herbal remedies. AnbarNesara is a seemingly worthless substance found in traditional medicine used in the treatment of many diseases. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic effects of the smoke from the burning of AnbarNesara on liver cancer cells and to investigate the genes expression changes of P53 and CYP2E1.

Materials and Methods: In the current experimental study, first AnbarNesara was collected from Dargaz region in spring and then the smoke from its fuel was collected in cold propyleneglycol. The amount of smoke in the solvent was calculated. Then, liver cancer cell line (HEPG2) and normal cell line were cultured. Cytotoxicity tests and morphological studies were performed and IC50 value was calculated. RNA extraction, cDNA synthesis, and Real Time PCR were performed to evaluate the expression of P53 and CYP2E1 genes. The results were analyzed using t-test and ANOVA at a significance level of $P < 0.05$.

Results: The results of morphological studies and toxicity test indicated that smoke from AnbarNesara fuel at a concentration of 58.5 mg/ml increases cancer cell mortality ($IC_{50}=48.79$) compared to that in the control group ($P < 0.05$). In the study of gene expression, while the concentration of 117 mg increased the expression of CYP2E1 gene, the P53 gene increased at the concentration of 58.5 ($P < 0.05$).

Conclusion: The smoke from burning AnbarNesara seems to have a lethal effect on liver cancer cells. Duration and concentration are significant in this effectiveness.

Keywords: HepG2 Cell Line; AnbarNesara; P53 gene; CYP2E1 gene

*Corresponding author: Khadije Shahrokhhabadi

Email: shahrokhhabady@yahoo.com

بررسی تاثیر دود سوخت عنبرنسارا بر تغییرات بیان ژن های P53 و CYP2E1 در سلول های سرطان کبد انسان

مریم کیخا آخر^۱، خدیجه شاهرخ آبادی^{۱*}، جواد بهارآرا^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ایران

پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۴

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۵

چکیده:

سابقه و هدف: سرطان همچنان مهم ترین علت مرگ بعد از بیماری های قلب و عروق و سوانح است. امروزه تلاش محققین برای بهره گیری از درمان هایی با حداقل عوارض جانبی و استفاده از طب سنتی و داروهای گیاهی بیشتر شده است. عنبرنسارا ماده ای به ظاهر بی ارزش جای خود را در طب سنتی پیدا کرده و در درمان بسیاری از بیماری ها کاربرد دارد. این مطالعه باهدف ارزیابی اثرات ضد سرطانی دود حاصل از سوختن عنبرنسارا، روی سلول های سرطانی کبد و بررسی تغییرات بیان ژن های P53 و CYP2E1 انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ابتدا عنبرنسارا از منطقه درگز، در فصل بهار، جمع آوری و سپس دود حاصل از سوختن آن در پروپیلن گلیکول سرد جمع آوری گردید. مقدار دود در حلال محاسبه گردید. رده سلولی سرطان کبد (HEPG2) و رده سلولی نرمال کشت گردید. تست سمیت سلولی و مطالعات مرفولوژی انجام و مقدار IC50 محاسبه شد. جهت بررسی میزان بیان ژن های P53 و CYP2E1، استخراج RNA، سنتز cDNA و Real Time PCR انجام شد. نتایج توسط آزمون های آماری t-test و ANOVA در سطح معناداری ($P < 0.05$) آنالیز گردید.

یافته ها: نتایج بررسی های مرفولوژیکی و تست سمیت بیانگر آن است که دود حاصل از سوختن عنبرنسارا در غلظت 5/58 میلی گرم در میلی لیتر سبب افزایش مرگ و میر سلول های سرطانی ($IC_{50} = 48.79$) در مقایسه با گروه شاهد می گردد ($P < 0.05$). در بررسی بیان ژن در حالیکه غلظت 117 میلی گرم باعث افزایش بیان ژن CYP2E1 شد، ژن P53 در غلظت 5/58 افزایش نشان داد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد دود حاصل از سوختن عنبرنسارا دارای اثر کشندگی بر سلول های سرطانی کبد می باشد. مدت زمان و غلظت در این اثربخشی موثر است.

واژگان کلیدی: رده سلولی HepG2، عنبرنسارا، ژن P53، ژن CYP2E1.

مقدمه

داروها را بر روی بیماری های سرطان می توان مدیریت و حتی عوارض جوانبی آنها را پیش بینی کرد. در سال های اخیر مطالعات مولکولی اساس مکانیسم تولید سرطان ها را توجیه کرده است و همچنین پیشرفت های تکنولوژی در بیوانفورماتیک و غربالگری مولکولی در شناخت زودرس سرطان به کمک بشر آمده است. در دهه اخیر نیز درمان شخصی انقلابی در درمان سرطان ایجاد کرده است. درمان شخصی به معنای به کارگیری دانش ژنومیک و دیگر مطالعات آزمایشگاهی برای انتخاب درمان مناسب برای یک فرد بیمار است. توسعه روش های نوین توانایی با بازده بالا امکان طبقه بندی زیرمجموعه های مولکولی تومور، شناسایی بیومارکرهای جدید و تولید داروهای هدفمند به منظور افزایش اثربخشی درمان و کاهش عوارض جانبی آنرا فراهم آورده است (۳-۴). سرطان کبد پنجمین بدخیمی شایع و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است. ویژگی هایی با میزان بالای عود و

سرطان بعد از بیماری های قلب و عروق و سوانح، با میزان ۱۴ درصد سومین علت مرگ و میر در کشور ما بشمار می رود. اگر چه سرطان ها تا حدود ۷۵ درصد قابل پیشگیری هستند اما روز به روز در حال گسترش می باشند. مطالعات نشان داده اند که در طول ۱۰ سال - از ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۰- سرطان ها فقط به دلیل تغییرات سنی جامعه در کشورهای در حال توسعه، به میزان ۷۱ درصد رشد داشته اند. سهم ایران نیز در بین کشورها بسیار زیاد است، زیرا به سرعت در حال مسن شدن است. در حالیکه در سال ۱۳۸۵ تعداد ۷۰ هزار مورد جدید سرطان در کشور ثبت شده است، این رقم در سال ۱۳۹۵ به ۱۲۰ هزار نفر رسیده است. با در نظر گرفتن دوره های بقاء نسبت به سرطان های مختلف در حال حاضر حداقل سیصد هزار بیمار سرطانی در کشور زندگی می کنند که در ده سال آینده به رقم ۶۰۰ هزار نفر خواهند رسید (۱-۲). امروزه اثرات

نویسنده مسئول: خدیجه شاهرخ آبادی

پست الکترونیک: Shahrokhahady@yahoo.com

گرفت و ۲۴ ساعت بعد محیط کشت تعویض شد. سپس سلول‌ها از نظر تعداد و تراکم زیر میکروسکوپ معکوس بررسی گردیدند. جهت انجام تست MTT به منظور به دست آوردن IC_{50} در پلیت ۹۶ خانه‌ای، پس از شمارش سلولی به هر چاهک پلیت، تعداد ۵۰۰۰ سلول اضافه گردید. جهت کاهش امکان خطا و افزایش ارزش نتایج، برای هر نمونه ۴ تکرار در نظر گرفته شد. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. تمامی این مراحل برای پلیت‌های ۴۸ ساعته و ۷۲ ساعته نیز انجام گرفت. هر سه پلیت ۲۴ ساعت پس از کشت سلولی توسط غلظت‌های مختلف محلول دود حاصل از عبورنماتیمار شدند. غلظت‌های مختلف بر حسب مقدار دود حل شده در پروپیلن و بصورت سریال دایلوژن تهیه گردید. مطالعه میزان تکثیر و مرفولوژی سلول‌ها و همچنین تست سمیت سلولی برای سه پلیت آماده شده پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان تیمار انجام گردید. برای این کار محیط روئی پلیت تخلیه و مقدار ۱۸ میکرولیتر MTT جهت سنجش سمیت سلولی به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده و به مدت سه تا چهار ساعت انکوبه گردید. پس از آن MTT تخلیه و به هر ول ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. آنگاه پلیت در دستگاه الایزریدر قرار گرفت و میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. این عمل در مورد دو پلیت دیگر پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، انجام شد.

برای استخراج RNA، سلول‌ها در شش فلاسک مناسب کشت داده شده و سپس تیمار شدند. یک فلاسک به عنوان کنترل و فلاسک‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} ، دو غلظت بالاتر از IC_{50} و دو غلظت پایین‌تر از IC_{50} در نظر گرفته شد. استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت (شرکت دنازیست) انجام شد. پس از استخراج RNA، نمونه‌ها از نظر کمیت و کیفیت با روش نانودراپ و ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ارزیابی بیان ژن‌های P53 و CYP2E1، سنتز cDNA با کیت شرکت پارس توس انجام گردید. بر اساس پروتکل کیت مراحل به صورت ۱۵ دقیقه نسخه برداری معکوس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، سپس در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت پنج ثانیه و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار گرفت. پرایمرهای مورد نیاز با استفاده از نرم افزار الیگو ۷ طراحی و از نظر کیفیت و صحت در NCBI، BLAST گردید. پرایمرها به شرکت ژن فن‌آوران سفارش داده شد و تهیه محلول کاری نیز پس از دریافت آن صورت گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش در جدول زیر آمده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

GENE Name	FORWARD 5'-3'	REVERSE 5'-3'
P53	CATCTGGCCTTGAAACCAC	AAACTACCAACCCACCGAC
CYP2E1	GCTCCATGAAGAAATTGACA	CATCTCTTGCCTATCCTTG
GAPDH	TGACTTCAACAGCGACACC	TTGCTGTAGCCAAATTCGTT

همچنین جهت انجام ریل تایم، پروفایل دمایی PCR در مخلوط نهایی به حجم ۱۲ میکرولیتر به صورت یک چرخه با ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس، ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی گراد برای پنج ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. رونوشت‌های اختصاصی تکثیر یافته نیز توسط پروفایل منحنی تکثیر که در انتهای هر PCR انجام می‌گرفت، تصدیق گشت. میزان بیان نسبی ژنهای مورد نظر نیز به وسیله تفاضل میانگین Ct ژنهای GAPDH به عنوان ژن کنترل و CYP2E1 و P53، به دست آمد. میزان تغییرات بیان ژنها نیز با استفاده از فرمول $\Delta\Delta CT-2$ محاسبه شد. آنالیز آماری تمامی داده‌های کمی حاصل در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه شاهد، با آزمون One Way Anova، t-test و آزمون تعقیبی دانت در سطح معناداری $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل گردید و میزان IC_{50} محاسبه گردید. جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS-۲۲ و جهت رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده شد.

یافته‌ها

تغییرات مرفولوژیکی سلول‌های سرطانی و نرمال تیمار شده با غلظت‌های مختلف دود عبورنماتیمار توسط میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های

متاستاز، تشخیص پایین در مراحل اولیه درمان و گزینه‌های درمانی کم اثر در سرطان کبد بویژه در نوع هیپاتوسلولار کارسینوما، این سرطان را بیماری با پیش‌آگهی ضعیف نشان می‌دهد (۵). گرچه عوامل خارجی موثر بر سرطان متعدد و گوناگون است اما در بسیاری از موارد ممکن است علل ژنتیکی باعث ایجاد سرطان شود (۶). از جمله ژن‌های مهم درگیر در سرطان کبد ژن‌های CYP2E1 و P53 است.

سیتوکروم P450E1 آنزیمی اصلی است که نقش عمده‌ای در فعال‌سازی و سمیت‌زدایی بسیاری از ژنوتوکسین‌ها، سرطان‌زاها یا کارسینوژن‌ها و داروها ایفا می‌کند. بیشترین توزیع آن در بافت کبد و به میزان کمتر در بافت‌های شش، کلیه، موکوس بینی، مغز استخوان، قلب و مغز بیان می‌شود (۷). بررسی انواع پلی‌مورفیسم در CYP2E1 به عنوان یک ضرورت اولیه خطر ابتلا به انواع سرطان در صورت تماس با ترکیبات کارسینوژن را نشان داده است. این پلی‌مورفیسم در افزایش خطر ابتلال به بیماری‌های حاصل از تماس با مواد شیمیایی و ایجاد انواع سرطان شامل سرطان دستگاه گوارش، سر و گردن، ریه، کلورکتال، دهان، مری و پستان نقش دارد (۸). این آنزیم همچنین مسئول فعالیت متابولیکی ترکیبات پیش سرطانزا (پروکارسینوژن) به ترکیبات سرطانزا (کارسینوژن) می‌باشد. بر همین اساس وجود پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی این آنزیم می‌تواند منجر به تغییر فعالیت آن در برابر ترکیبات سرطانزای شیمیایی و یا طبیعی شود. برای روشن شدن اهمیت پلی‌مورفیسم آن بررسی‌های گوناگونی در مورد فارماکوکینتیک آنزیم‌های فاز اول متابولیسم‌کننده مواد سمی و دارویی انجام شده است. ژن CYP2E1 نقش عمده در متابولیسم، فعال‌سازی، سمیت‌زایی و سم‌زدایی برخی از ترکیبات با وزن مولکولی کم مانند اتانول، استر، داروهایی مانند استامینوفن، ایزونیاژید، بیهوش‌کننده‌های فلورینه و شماری از ترکیبات پروکارسینوژن مانند بنزن، استیرن، اورتان و اکربلونیتیل دارد و به همین علت در سم‌شناسی مورد توجه قرار گرفته است (۹).

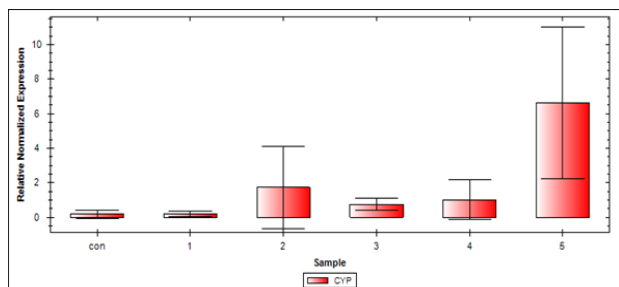
تغییرات در ژن سرکوب‌کننده تومور P53، درغالب انواع مختلف سرطان یافت شده و به عنوان نشانگرهای مولکولی سرطان منجر به شایع‌ترین آنومالی‌ها در تومورهای انسانی شده و یکی از بیشترین بیومارکرهایی است که در سرطان‌های انسان مطالعه شده است. در واقع فعال شدن این بیومارکر از طریق ایجاد نقایصی در ترمیم DNA و فرآیند آپوپتوزیس همراه با افزایش در بی‌ثباتی ژنی منجر به تجمع موتاسیون‌ها می‌شود. بر اساس مطالعات، می‌توان با تشخیص پروتئین P53 به روش ایمونوهیستوشیمیایی از آن به عنوان یک ابزار قابل اعتماد جهت نشان دادن تغییرات سطح ژن P53 استفاده کرد (۱۰).

این مطالعه با هدف بررسی تأثیرات دود حاصل از سوخت عبورنماتیمار بر روی تکثیر و زیستایی سلول‌های سرطانی کبد نسبت به سلول‌های نرمال و همچنین بیان ژن‌های CYP2E1 و P53 انجام گردید. جهت جمع‌آوری دود حاصل از سوختن عبورنماتیمار از پروپیلن کلیکول به عنوان حلال استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

عبورنماتیمار مورد استفاده در این مطالعه تجزیه‌ای از الاغ ماده‌ای که به تازگی زایمان کرده بود، در فصل بهار از منطقه قلعه مینای درگز جمع‌آوری گردید. سپس ۱۰۰ گرم از عبورنماتیمار جمع‌آوری شده با استفاده از دستگاه طراحی شده در آزمایشگاه سوزانده و دود حاصل در ۱-۲ سی‌سی پروپیلن سرد به صورت محلول جمع‌آوری گردید (۱۱). دودگیری تا آنجا ادامه پیدا کرد که رنگ شفاف پروپیلن به رنگ قهوه‌ای تیره تبدیل شد. سپس مقدار وزن دود حل شده در یک میلی‌لیتر محلول (بر حسب میلی‌گرم) از تفاضل وزن یک میلی‌لیتر محلول حاوی دود با یک میلی‌لیتر پروپیلن گلیکول بدست آمد. در این تحقیق از سلول‌های سرطانی کبد انسان (HepG2) استفاده گردید. این سلول‌ها در ظاهر شبیه سلول‌های سنگفرشی با ۵۵ کروموزوم بوده که بسیاری از پروتئین‌های پلاسمایی مانند آلبومین و ترانسفرین را ترشح می‌کنند و به عنوان مدل مناسبی جهت مطالعه سمیت سلولی و پیدا کردن مواد سرطانزای کبدی و مطالعات دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲). رده سلولی HepG2 و L9۲۹ به صورت فریز شده از انستیتو پاستور تهیه و سپس در محیط کشت DMEM حاوی FBS و آنتی بیوتیک داخل انکوباتور CO_2 دار با دمای $37^{\circ}C$ ، رطوبت ۹۰٪ و CO_2 ۵٪ قرار

غلظت های مختلف افزایش میزان بیان ژن نسبت به کنترل دیده می شود. بیشترین میزان بیان ژن مربوط به ستون ۵، یعنی غلظت ۱۱۷ میلی گرم می باشد. این نتایج نشان می دهد که دود در بالاترین میزان غلظت موجب تحریک بیان ژن شده است. سطح معناداری $p > 0.05$ در نظر گرفته شده است.

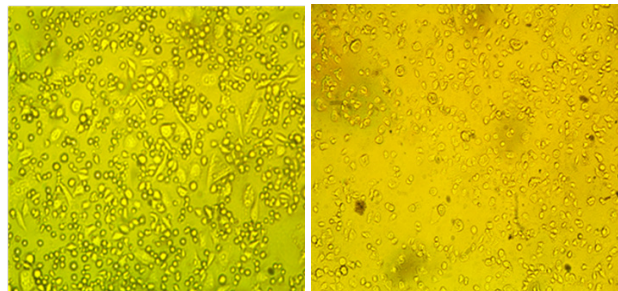


نمودار ۳: میزان بیان ژن CYP2E1 بر حسب غلظت های مختلف دود عنبرنسار. ستون ۱: غلظت ۷/۱۱ mg/ml، ستون ۲: غلظت ۲۵/۲۹ mg/ml، ستون ۳: غلظت ۵/۵۸ mg/ml، ستون ۴: غلظت ۷۵ mg/ml/۸۷، ستون ۵: غلظت ۱۱۷ mg/ml. سطح معناداری $p > 0.05$ در نظر گرفته شده است.

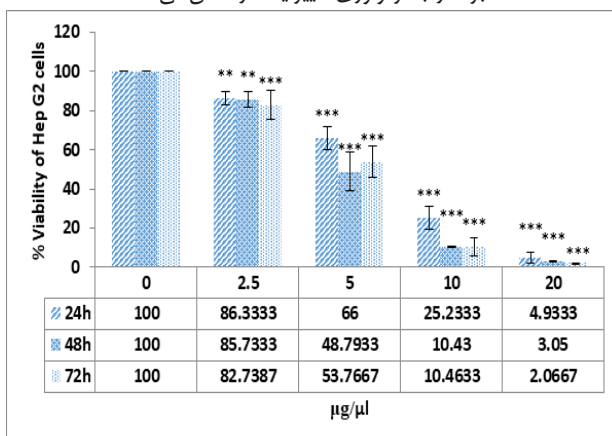
بحث

نتایج حاصل از این پژوهش اثر مهارکنندگی دود جمع آوری شده از عنبرنسار بر روی رشد سلول های سرطانی را نشان داد. از آنجایی که از دیدگاه پژوهشی و علمی، سودمندی روش های سنتی و دارویی باید از نظر آزمایشگاهی و بالینی مورد تایید قرار گیرند، و با توجه به استفاده وسیع از عنبرنسار توسط عموم جامعه در درمان بعضی از بیماری ها، و با توجه به اینکه تاکنون در زمینه اثربخشی دود عنبرنسار بر سلول های سرطانی کبد مطالعه ای صورت نگرفته است، لذا در این پژوهش تلاش شده است که اثربخش بودن یا نبودن این ماده مورد بررسی قرار گیرد (۱۳). نتایج مرفولوژی و تست سمیت سلولی نشان داد در غلظت ۵۸/۵ میلی گرم بر میلی لیتر حدود نیمی از سلول ها از بین رفته اند (IC₅₀). همچنین در همین غلظت بیشترین میزان بیان ژن P53 و در غلظت ۱۱۷ بیشترین میزان بیان ژن CYP2E1 مشاهده شد. در تحقیقی در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی اجزاء عنبرنسار با استفاده از دستگاه GC-MS از یکدیگر جدا شدند. این اجزاء شامل هگزان، اسید اسیتیک، آکونیتین، بتاکاروتن و دی متیل آمین بوده است که همگی خواص آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریال، ضد قارچ و ضد التهابی هستند (۱۴). همچنین در مطالعه عزیزی و همکاران اثر آناس (دود عنبرنسار حل شده در پروپیلن گلیکول) بر سطح بیان سایتوکاین التهابی IL-8 در رده سلولی HT-29 القا شده توسط لیپوپلی ساکراید (LPS) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه بیانگر افزایش بیان IL-8 در سلول های تحت تیمار با LPS و کاهش معنادار آن در سلول های تیمار شده با LPS به همراه آناس بود که می تواند دلیلی بر خاصیت ضد التهابی آناس باشد (۱۱). مطالعه عزیزی و همکاران نزدیک ترین مطالعه با توجه به ترکیب آناس و بررسی بیان ژن ها، با مطالعه ما می باشد. در مطالعه ما تغییرات بیان ژن در سلول های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که دود دارویی بیان ژن ها را افزایش می دهد. در آزمایش دیگری از دود عنبرنسار بعنوان دهان شویه استفاده شد، نتایج نشان دهنده مهار رشد میکروب ها، باکتری های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سالیاریوس بود، یعنی دود عنبرنسار همانند دهان شویه کلرهگزیدین عمل کرده بود (۱۵). پروین و همکاران در مطالعه ای با هدف مقایسه خواص ضد میکروبی دود حاصل از دانه های اسپند و سرگین بر روی سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس دریافتند که استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به دود سرگین و اسپند و سودوموناس آئروژینوزا نسبت به سرگین حساس بودند، با افزایش زمان دود دهی، قطر هاله عدم رشد در موارد حساس بزرگتر شده و به عبارت دیگر اثرات ضد میکروبی دود افزایش می یافت (۱۶). محقق زاده و همکاران، در مطالعه دیگری با عنوان ارزیابی سیتوتوکسیک دود ناشی از عنبرنسار روی دو رده سلول سرطان دهانه رحم و حنجره و یک

سرطانی تیمار نشده دوکی شکل هستند که در اثر مواجه با دود و بسته به غلظت آن، سلول ها دچار مرگ و میر سلولی شدند. همچنین دود عنبرنسار در غلظت ۵۸/۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین میزان مرگ و میر نسبت به گروه شاهد را ایجاد کرده است. علاوه بر آن در غلظت ۰/۳۴ میلی گرم در میلی لیتر نیمی از سلول های سرطانی تیمار شده دچار مرگ و میر سلولی شدند. شکل ۱ میزان مرگ و میر سلول های HepG2 تیمار شده با دود را در مقایسه با گروه شاهد نشان می دهد. همچنین نمودار ۱ میزان تأثیر غلظت های مختلف دود عنبرنسار بر زیستایی سلول های سرطانی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در تست سمیت سلولی را نشان می دهد.

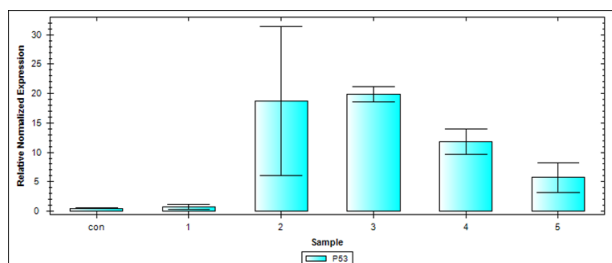


شکل ۱: مرفولوژی سلول های سرطانی تحت تأثیر دود عنبرنسار. سمت راست سلول های شاهد با مرفولوژی دوکی شکل و سمت چپ سلول ها تحت تأثیر دود عنبرنسار با مرفولوژی تغییر یافته را نشان می دهد.



نمودار ۱: میزان زیستایی سلول های سرطانی بر حسب زمان های مواجه با دود عنبرنسار. (دو ستاره نشان دهنده سطح معناداری ۰/۰۱ و سه ستاره نشان دهنده سطح معناداری ۰/۰۰۱ می باشد).

نمودار ۲ نتایج ریل تایم ژن P53 را نشان می دهد. در غلظت های مختلف افزایش میزان بیان ژن نسبت به کنترل دیده می شود. اما بیشترین میزان بیان ژن مربوط به ستون ۳، یعنی غلظت ۵۸/۵ میلی گرم در میلی لیتر می باشد. سطح معناداری $p > 0.05$ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۲: میزان بیان ژن P53 بر حسب غلظت های مختلف دود عنبرنسار. ستون ۱: غلظت ۷/۱۱ mg/ml، ستون ۲: غلظت ۲۵/۲۹ mg/ml، ستون ۳: غلظت ۵/۵۸ mg/ml، ستون ۴: غلظت ۷۵ mg/ml/۸۷، ستون ۵: غلظت ۱۱۷ mg/ml. سطح معناداری $p > 0.05$ در نظر گرفته شده است.

نمودار ۳- نتایج ریل تایم را در بررسی بیان ژن CYP2E1 نشان می دهد. در

همین رویکرد انجام گردید و از نتایج حاصل از آن نیز اطلاعات ارزشمندی به دست آمده است. در این مطالعه بیان ژن CYP بررسی گردید که طبق نمودار ۲ در غلظت ۱۱۷ میلی گرم افزایش بیان دیده شد. بر طبق مطالعات قبلی این ژن نقش عمده‌ای در متابولیسم ترکیبات با وزن مولکولی کم مثل اتانل دارد (۹). شاید عدم بیان ژن در غلظت‌های کمتر دود در این پژوهش مربوط به چگالی و وزن مولکولی ماده موثره باشد، لذا به نظر می‌رسد باید مطالعات بیشتری با غلظت‌های متنوع‌تری در این خصوص صورت گیرد. بر خلاف ژن CYP، ژن P53 در غلظت IC50 دارای بیشترین بیان است و با افزایش غلظت میزان بیان آن کاهش می‌یابد. ژن P53 روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۷ قرار دارد و یک سرکوب کننده تومور را کد می‌کند که در بیشتر سرطان‌های انسانی دچار جهش می‌شود. ویژگی بارز این جهش‌ها این است که با پراکندگی زیاد بر روی بیش از ۲۰۰ کدون مختلف روی می‌دهند (۲۰). با توجه به نقش این ژن به عنوان یک تومورسوپرسور، بنابراین همسویی میزان بیان ژن با مرگ سلولی در این پژوهش دیده می‌شود. این به معنای اثربخشی دود حاصل از عنبرنسارا بر بیان ژن و محدودیت تکثیر سلول سرطانی است.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد دود حاصل از سوخت عنبرنسارا سبب عدم تکثیر و افزایش مرگ سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که دود عنبرنسارا احتمالاً می‌تواند بر اساس غلظت و زمان دارای اثر کشندگی بر روی سلول‌های سرطانی کبد انسان باشد.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از همراهی گروه زیست شناسی و همچنین همکاران در پژوهش‌کده خوارزمی دانشگاه آزاد اسلامی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

- Noori-Daloii M, Zakidizji M, Khavandi S, Rostami SH, Yaseri M, Alimoghaddam K, Ghavamzade A, Ghafari H. Metastasis: review article. *Tehran Univ Med. Iranian J Pharm Res* 2011; 10: 741-748.
- Noori-Daloii M. Targeted cancer therapy: review article. *Tehran Univ Med. Iranian J Pharm Res* 2011; 12:780-788.
- Noori-Daloii M, Kashani B. Targeted cancer therapy: review article. *Tehran Univ Med J* 2018; 76 (4):231-240
- Abuthnot P, Kew M, Fitch W. C-fos, c-myc oncoprotein expression in human hepatocellular carcinomas. *Anti Cancer Res* 1991; 11: 921-4.
- Ramadori G, Moriconi F, Malik L, Dudas J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *Physiol Pharma J* 2008; Suppl 1:107-117.
- Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 2005; 11:7391-7400.
- Garcia-Suastegui WA, Ramos-Chavez LA, Rubio-Osornio M, Calvillo-Velascon M, Atzin-Mendez JA, Guevara J, and Silva-Adaya D. The Role of CYP2E1 in the Drug Metabolism or Bioactivation in the Brain. *Oxid Med and Cellular Longevity*; 2017, Article ID 4680732, 14 pages, <https://doi.org/10.1155/2017/4680732>
- Kitam VO, Maksymchuk OV and Chashchyn M. The possible mechanisms of CYP2E1 interactions with HSP90 and the influence of ethanol on them. *BMC Structural Biology* 2012; 12(33), <http://www.biomedcentral.com/1472-6807/12/33>
- Kamalipour S, Barzegar A, Nikbakht N, Shokrzadeh M. Study of CYP2E1 Gene RsaI/PstI Polymorphisms in Patients with Gastric Cancer in North of Iran. *Res in Mol Med* 2016; 4(3), 22-27.
- Noori-Daloii M.R, Abdollahzade R. Role of P53 in apoptosis and cancer therapy. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences* 2014; 20(3), 191-201
- Azizi F, Al-Bouyeh M, Jooharchi Kh, Azmirad M, Javadi Gh. Evaluation of IL-8 gene expression by anas solution in intestinal epithelial HT-29 cell line, (Dissertation for the degree of MSc of Education). Graduate of Islamic Azad University of Tehran, 2016-2017. [Persian]

رده نرمال دریافتند که دود ناشی از سوختن عنبرنسارا روی رده‌های سلولی فوق الذکر در غلظت معادل ۲ میلی گرم یا کمتر اثر کشنده دارد (۱۷). طالبی و همکاران در سال ۱۳۹۶ در مطالعه‌ای با مقایسه خواص ضد میکروبی دود حاصل از عنبرنسارا با آنتی بیوتیک‌های رایج بر روی باکتری آسینوباکتر بومانی دریافتند که میانگین هاله عدم رشد باکتری تحت اثر با عنبرنسارا به طور معناداری بیشتر از هاله عدم رشد آنتی بیوتیک انتخابی بود (۱۸). عنبرنسارا سرگین ماده الاغ است که در فصل بهار جمع‌آوری می‌شود، برخی معتقدند اولین پشگل کره الاغ بعد از تولد است. این ماده را مانند اسپند دود کرده و دود ناشی از آن را استنشاق می‌نمایند. این ماده در ظاهر بی ارزش، که به نظر می‌رسد تنها می‌تواند به عنوان کود حیوانی کاربرد داشته باشد، مدت هاست که جای خود را در طب سنتی پیدا کرده و در درمان بسیاری از بیماری‌ها به خصوص بیماری‌های عفونی کاربرد دارد (۱۷). بهترین زمان جمع‌آوری عنبرنسارا در فصل بهار است، الاغ ماده در فصل بهار از بهترین گیاهان داروئی تغذیه می‌کند و دود کردن آن در واقع یعنی دود کردن ده‌ها گیاه داروئی به صورت همزمان، این دود هیچگونه اثر سوئی ندارد و البته بوی آن بسیار ناخوشایند است. در طب سنتی این ماده را مانند اسپند دود کرده و دود ناشی از آن را در اتاق پراکنده می‌ساختند و معتقد بودند این دود خاصیت میکروب‌کشی و ضد عفونی‌کنندگی دارد. برخی از خواص ذکر شده برای عنبرنسارا شامل درمان سرماخوردگی یا برونشیت، خارش پوست، عفونت‌های واژینال، بواسیر، درد دندان، تسهیل زایمان طبیعی، کاهش حجم و زمان خونریزی سیکل ماهیانه، تقویت کننده تارهای صوتی، بند آوردن خون دماغ، درمان آسم، برطرف کننده زخم‌های چرکین، درمان صرع و درمان آفت دهان می‌باشد (۱۹). با توجه به همه این مطالب و نیز تلاش محققین برای بهره‌گیری از درمان‌هایی با حداقل عوارض جانبی و اثرات سوء داروهای شیمیایی، استفاده از طب سنتی و داروهای گیاهی بخصوص در سال‌های اخیر شیوع بیشتری در بین محققین یافته است. این مطالعه تجربی نیز با

- nal epithelial HT-29 cell line, (Dissertation for the degree of MSc of Education). Graduate of Islamic Azad University of Tehran, 2016-2017. [Persian]
- Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol* 2000; 10(3):185-200.
- Mudway IS, Duggan ST, Venkataraman C, Habib G, Kelly FJ, Grigg J. Combustion of dried animal dung as biofuel results in the generation of highly redox active fine particulates. *Part Fibre Toxicol* 2005; 2: 6-16.
- Noori-Daloii M, Eshaghkhani Y. Targeted cancer therapy: review article. *Tehran Univ Med. Iranian J Pharm Res* 2011; 10:705-707.
- Mirian M, Zarghi A, Sadeghi S, Tabaraki P, Tavallae M, Dadrass O, et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of some novel sulfonamide derivatives against a few human cancer cells. *Iranian J Pharm Res* 2011; 10(4): 741-748.
- Parvin N, Validi M, Banitalebi M, Mobini G, Ashrafi K, Farrokhi E, et al. Effect of medicinal smokes on some nosocomial infection factors. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2010; 12 (2): 76-83. [Persian]
- MohagheghZadeh A, Faridi P, Shams Ardakani M, Ghasemi Y. Medicinal smokes. *Journal of Ethnopharmacol* 2006; 108: 161-184. [Persian]
- Talebi A. Esfahan University of Medical Sciences, Zootherapy. 196.
- Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer *Cancer Cell* 2007; 11, 103-110.
- Lun-Xio Qin, Zhao-You Tang, Zeng-Chen Ma, Zhi-Quan Wu, Xin-Da Zhou, Qing-Hai Ye, et al. P53 immunohistochemical scoring: an independent prognostic marker for patients after hepatocellular carcinoma resection. *World J Gastroenterol* 2002; 8(3): 459-63.