

اثر عصاره گیاه *Dendrostellera lessertii* بر ترشح $TNF-\alpha$ و تنظیم کاهشی گیرنده های آن بر سطح مونوسیت های انسانی در محیط کشت

دکتر مهدی هدایتی، دکتر راضیه یزدانپرست، دکتر بهار جعفری بروجردی، دکتر فریدون عزیزی*

* مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به تاثیر عصاره آب الکلی (۵۰:۵۰) برگ گیاه *Dendrostellera lessertii* (سیاه گینه) در کاهش اندازه و تعداد تومورهای آدنوکارسینوم روده بزرگ و پستان در رت، جهت بررسی مکانیزم عمل این عصاره، در این مطالعه بررسی تاثیر عصاره مذکور بر رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا و تعداد گیرنده های این فاکتور بروی مونوسیت های انسانی در محیط کشت انجام شد.

روش بررسی: توسط دی-متیل هیدرازین تومور روده بزرگ و توسط دی-متیل بنزانتراسن تومور پستان در رت های ماده ایجاد شد. تاثیر خوراکی عصاره آب الکلی (۵۰:۵۰) برگ گیاه سیاه گینه بر کاهش حجم و حذف تومورهای مذکور بررسی شد. جهت جداسازی و خالص نمودن مونوسیت های انسانی از روش گرادیان دانسیته بهره گرفته شد. اندازه گیری فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا توسط روش حساس الایزای بیوتین استریتوآویدین صورت پذیرفت. بررسی تعداد گیرنده های فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا توسط نشاندارسازی رادیوآکتیوی به کمک ید ۱۲۵ و دستگاه گاما کانتر انجام گرفت.

یافته ها: تجویز روزانه خوراکی عصاره آب الکلی (۵۰:۵۰) برگ های گیاه سیاه گینه به مدت ۲۰ هفته متوالی سبب حذف و یا کاهش اندازه تومورهای پستان و همچنین تحلیل تومورهای روده بزرگ در رت های آزمایشگاهی شد. این عصاره در مسیری وابسته به دوز بتدریج سبب افزایش ترشح فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا می گردد. در مسیری وابسته به زمان در کمتر از ۹۰ دقیقه عصاره مذکور باعث تنظیم کاهشی شدید تعداد گیرنده های فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا بروی مونوسیت ها در محیط کشت می شود.

نتیجه گیری: عصاره آب الکلی (۵۰:۵۰) برگ های گیاه سیاه گینه سبب کاهش تومورهای آدنوکارسینومای روده بزرگ و آدنوکارسینومای پستان رت می گردد. در بررسی مکانیزم عمل این عصاره معلوم شد که عصاره مذکور مشابه داروی گیاهی آنتی-نئوپلاستیک تاکسول، سبب تحریک رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا توسط مونوسیت ها در محیط کشت می گردد و در ضمن این عصاره سبب تنظیم کاهشی تعداد گیرنده های فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا در سطح مونوسیت های انسانی می گردد.

واژگان کلیدی: فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا، تاکسول، تومور پستان، سیاه گینه.

مقدمه

سابقه استفاده از گونه های مختلف گیاه دافنه (تیمه لاسه) در درمان سرطان به ۲۰۰ سال پس از میلاد بر می گردد (۴-۱). علیرغم گزارشات مربوط به اثرات دارویی این رده و گونه

گیاهی در کشورهای مختلف، گزارشی در مورد کاربرد دارویی گونه و جنس ایرانی این گیاه یعنی سیاه گینه (*Dendrostellera lessertii*) وجود ندارد. لذا دنبال جستجوی داروهای گیاهی با خاصیت ضد سرطانی، از گیاهان خانواده Thymelaceae در ایران، در این تحقیق اثر ضد توموری و سیتوتوکسیسیته عصاره آب الکلی (۵۰:۵۰) برگ های این گیاه بروی تومورهای القاء شده روده بزرگ و همچنین پستان در رت مورد مطالعه قرار گرفت. پس از مشخص شدن اثرات

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دکتر مهدی هدایتی (email: hedayati@erc.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۱۱/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۶/۱۳

ضدتوموری این عصاره، به منظور بررسی مکانیزم عمل آن، تاثیر عصاره این گیاه بر رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا (TNF- α) و نیز تعداد گیرنده‌های این فاکتور بر سطح مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت در حضور و غیاب لیپوپلی‌ساکارید مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین در تمام مراحل از داروی تاکسول (داروی آنتی‌نئوپلاستیک طبیعی از پوست درخت سرخدار) جهت مقایسه استفاده شد. بر اساس گزارشات متعدد، تاکسول مانند لیپوپلی‌ساکارید، سبب افزایش رهایی فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا از مونوسیت‌ها می‌گردد (۹-۵). داده‌های حاصل از این تحقیق نیز اثرات مشابهی را برای عصاره سیاه گینه مطرح می‌سازد، با این تفاوت که این اثرات در حضور لیپوپلی‌ساکارید افزوده و یا تقویت نمی‌گردد.

مواد و روشها

فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا، لیپوپلی‌ساکارید سالمونلا تیفوئوریم، آری‌ام‌آی ۱۶۴۰، نئومایسین، پنی‌سیلین و سایر مواد شیمیایی از کمپانی سیگما خریداری شد. یدید سدیم رادیواکتیو (۱۲۵) از آژانس انرژی اتمی ایران و لوکوسیت‌های افراد سالم اهداکننده خون از سازمان انتقال خون ایران تهیه گردید. داروی تاکسول نیز به عنوان ترکیبی شاهد در تحریک رهایی فاکتور نکروز دهنده توموری از شرکت سیگما خریداری گردید.

مواد گیاهی: گیاه سیاه گینه در انتهای فصل بهار از اطراف شهر اصفهان جمع‌آوری و در اتاق مخصوص خشک کردن گیاهان در دانشکده علوم دانشگاه تهران، بدور از تابش مستقیم نور خشک و نگهداری شد. سپس برگ‌ها از ساقه جدا و به صورت پودر در اتاق سرد نگهداری شد.

استخراج عصاره: پودر مذکور سه مرتبه با مخلوط حجمی یک به یک آب/اتانل (۵۰:۵۰) استخراج و سپس تحت خلاء تغلیظ و در دمای ۲۰- نگهداری شد. در نهایت هر میلی‌لیتر از عصاره نهایی معادل ۱ گرم پودر گیاه بود.

تخمین دوز نیمه‌کشنده (LC50): توان بیولوژیک عصاره مذکور بر اساس آزمایش مک مولین و همکاران (۱۰) بروی میگوی آب‌شور (*Artemia Solina*) انجام شد. در ویال‌های حاوی مقادیر مختلف عصاره مذکور، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقابل نور و دمای اتاق، درصد مرگ و میر در غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی تعیین و طبق رابطه ذیل اصلاح گردید.

$$\%death = \frac{([test-control]/control) \times 100}{}$$

دوز نیمه کشنده عصاره بر اساس روش فینی معین شد (۱۱).

حیوانات: به منظور القاء تومور روده، رت‌های نر خریداری شده از حصارک رازی تهران (Sprague Dawley)، یک ماه قبل از دریافت ماده کارسینوژن دی‌متیل‌هیدرازین (dimethyl hydrazine) تحت رژیم پر چرب قرار گرفتند و سپس به دو گروه کنترل و آزمون تقسیم شدند. گروه آزمون از پنجاه روزگی، به مدت ۱۲ هفته، هر هفته یک بار تزریق صفاقی دی‌متیل‌هیدرازین (۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان در قالب محلول ۱ میلی‌مولار، در بافر حاوی EDTA و اسیدیت ۶/۵) دریافت و گروه کنترل نیز به همین میزان از بافر فاقد کارسینوژن دریافت می‌کردند. ۱۸ هفته پس از آخرین تزریق دو رت از گروه آزمون بطور انتخابی جدا و روده‌های کوچک و بزرگ آنها از لحاظ تومور مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تایید پاتولوژیست مبنی بر وجود تومورهای آدنوکارسینومای روده، رت‌های آزمون به دو گروه دریافت‌کننده عصاره گیاهی و کنترل تقسیم شدند. گروه اول به مدت ۱۰ هفته روزانه نیم میلی‌لیتر عصاره خوراکی (معادل نیم‌گرم پودر گیاه) دریافت می‌کردند. به گروه کنترل نیز در زمان مذکور معادل همین میزان آب مقطر تجویز می‌شد. پس از ۱۰ هفته رت‌های دو گروه جهت بررسی تومورهای روده به پاتولوژیست ارجاع داده شدند. جهت القاء تومور پستانی، رت‌های ماده (Sprague Dawley) خریداری شده از ۲۱ روزگی با آغشته کردن غذای آنها با ۲۰٪ روغن ذرت و خشک کردن در دمای ۳۷ درجه، تحت رژیم پرچرب قرار داشتند. از ۵۰ روزگی با تجویز دی‌متیل‌بنزانتراسن (demethyl benzantracene) (۵ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر روغن ذرت) تومور پستان در رت‌ها القاء شد. این عمل به مدت چهار هفته متوالی و دوبار در هفته انجام می‌گرفت. جهت کاهش اثر مواد غذایی چرب بر جذب روده‌ای کارسینوژن ۱۲ ساعت قبل از تجویز کارسینوژن رژیم عادی غذایی اعمال شد. پس از ۱۲ ساعت از تجویز کارسینوژن، مجدد از رژیم پرچرب استفاده می‌شد. شرایط مشابهی برای گروه کنترل اعمال می‌شد. ابعاد تومورهای بوجود آمده هر هفته در دو قطر عمود بر هم توسط ورنیه اندازه‌گیری می‌شد. رت‌های توموردار از بقیه جدا و به دو گروه کنترل و آزمون تقسیم شدند. گروه آزمون ده هفته متوالی روزانه نیم میلی‌لیتر عصاره خوراکی (معادل نیم‌گرم پودر گیاه) و گروه کنترل به همان میزان آب مقطر دریافت می‌کردند. پس از اندازه‌گیری ابعاد تومور در رت‌ها، حجم تومور از رابطه ذیل محاسبه می‌گردید: $V = L \times W^2 / 2$ که در آن V = حجم، L = طول و W = قطر می‌باشد.

یدد/ارکردن فاکتور نکروردهنده بافتی/آلفا: نشاندارسازی رادیواکتیو فاکتور نکروردهنده بافتی آلفا توسط ید ۱۲۵ به کمک روش گرین وود و همکاران انجام پذیرفت (۱۴). در روش مذکور فاکتور نکروردهنده بافتی آلفا (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با یدید سدیم (۵/۱۸×۱۰۶ بکرل) و کلرآمین تی (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و سپس ۱۰ میکرولیتر محلول سدیم متابی سولفیت (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به آن افزوده و پس از ۲ دقیقه ۱۰ میکرولیتر محلول یدید پتاسیم (۵۰ میکرومولار در بافر تریس) به آن افزوده گردید. جداسازی مولکول نشاندار شده از سایر مولکول‌ها توسط سفادکس جی ۲۵ در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۶/۸، حاوی ۰/۲۵ درصد ژلاتین انجام پذیرفت.

جداسازی مونوسیت‌ها: جداسازی مونوسیت‌های انسانی از بسته‌های لوکوپک به دو روش چسبندگی سلولی (۱۵) انجام گرفت. در روش مذکور سلول‌های چسبیده به ظروف پتری کمپانی نانک دو مرتبه با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند و به صورت سوسپانسیون حاوی ۵ میلیون سلول در میلی‌لیتر به محیط کشت افزوده شدند. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در محیط کشت حاوی ۵٪ دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه، سلول‌های نچسبیده با ۳ تا ۴ بار شستشو با بافر سرد فسفات سالین از محیط خارج شدند. در نهایت سلول‌های مونوسیت چسبیده با کمک میله تفلونی و بافر فسفات سالین حاوی EDTA جدا و در محیط کشت با غلظت ۵۰۰ هزار سلول در میلی‌لیتر سوسپانسیون گردیدند (۱۱، ۱۲).

محیط کشت: در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای به صورت دوپل یک میلیون سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت (آرپی‌ام آی ۱۶۴۰، حاوی ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم جنین گوساله) افزوده شد. پس از ۲۰ ساعت مقادیر متفاوت عصاره گیاه سیاه گینه تا حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر به خانه‌های مختلف اضافه گردید و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه شدند. البته برای سنجش گیرنده‌های فاکتور نکروردهنده آلفا حداکثر ۲ ساعت انکوبه شدند. به منظور تحریک مونوسیت‌ها از رقت ۱:۱۰۰ عصاره غلیظ گیاه مذکور (معادل ۱ گرم پودر گیاه در میلی‌لیتر) به حجم‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکرولیتر یک بار در حضور ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید و یک بار در غیاب آن استفاده شد. این تحریک با اثر تحریک تاکسول، با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار مقایسه شد.

تعیین غلظت فاکتور نکروردهنده آلفا: میزان فاکتور نکروردهنده آلفا در محلول فوقانی محیط کشتهای مذکور با روش الایزای بیوتین-استرپتواویدین طراحی شده در آزمایشگاه پژوهشی مرکز تحقیقات غدد درون ریز دانشگاه شهید بهشتی (۱۷) اندازه‌گیری شد. بطور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوقانی محیط کشتهای به هر چاهک کیت الایزا افزوده و یک ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه بعد از شستشوی چاهکها (بافر فسفات سالین حاوی ۰/۰۵ درصد تویین ۲۰) به آنها افزوده و مجدداً یک ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر انکوبه شد. بعد از این زمان و شستشوی مجدد ۱۰۰ میکرولیتر کنژوگه پراکسیداز-استرپتواویدین به چاهکها افزوده و نیم ساعت در شرایط فوق انکوبه شدند. در نهایت پس از شستشو و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر تترامیل‌بنزیدین و آب اکسیژنه و نیم ساعت انکوباسیون توسط ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک واکنش متوقف و نتیجه آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. میزان فاکتور نکروردهنده آلفا بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید.

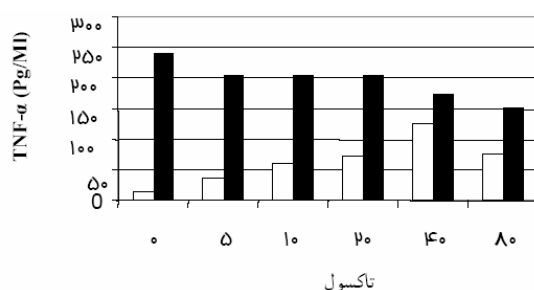
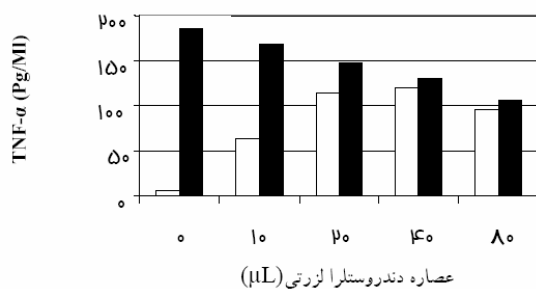
اندازه‌گیری گیرنده‌های فاکتور نکروردهنده آلفا: به خانه‌های مربوط به کنترل و آزمون (تحت تاثیر مقادیر مختلف عصاره گیاه)، حاوی مونوسیت‌ها، در فواصل زمانی مختلف ۱۰۰ میکرولیتر از فاکتور نکروردهنده آلفای نشاندار شده با ید رادیواکتیو افزوده و پس از چهار مرتبه شستشو با محیط کشت و جداسازی سلول‌ها با سانتریفیوژ (با نیروی ۳۰۰ جی، برای ۵ دقیقه) رادیواکتیویته سلول‌ها که متناسب با تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروردهنده آلفا می‌باشد با دستگاه گاما کانتر مورد شمارش قرار گرفت.

یافته‌ها

سنجش زیستی (Bioassay): توان بیولوژیکی عصاره آب‌الکلی سیاه گینه بر اساس تست میگو، دوز نیمه کشنده آن معادل ۰/۰۵۰ میلی‌گرم پودر برگ گیاه در میلی‌لیتر محاسبه گردید. فعالیت ضد توموری: تومور پستان در ۶۲٪ رت‌های تحت تاثیر دی‌متیل‌بنزآنتراسن بوجود آمد. بطور متوسط در هر رت ۲ تا ۳ تومور تشکیل شد. نوع تومور توسط پاتولوژیست کارسینوما و آدنوکارسینوما گزارش گردید. طبق تصویر شماره یک اندازه سه تومور انتخاب شده در رت‌های کنترل در مدت ۲۰ هفته به بیش از ۲/۸ میلی‌متر مکعب رسید در حالی که اندازه تومورها در رت‌های دریافت‌کننده عصاره این گیاه (روزانه ۰/۵

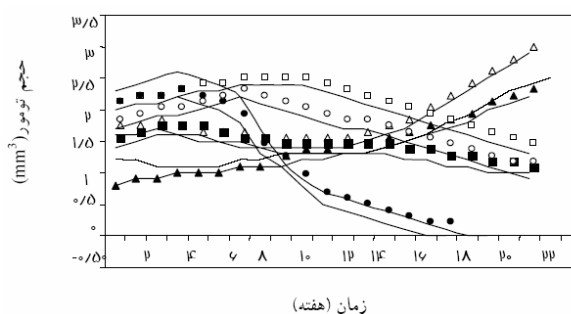
طبق گزارشات قبلی یکی از مسیرهای عملکرد داروی آنتی‌نئوپلاستیک تاکسول با منشاء گیاهی افزایش رهایی فاکتور نکروزدهنده آلفا توسط مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌باشد (۱۸). لذا تاثیر عصاره گیاه سیاه گینه با غلظتهای مختلف و وابسته به زمان مورد مطالعه قرار گرفت.

اثر عصاره در ترشح فاکتور نکروزدهنده آلفا: تصویر شماره ۳ نشان می‌دهد که عصاره برگ گیاه سیاه گینه به طریق وابسته به دوز، مانند تاکسول سبب افزایش ترشح فاکتور نکروزدهنده آلفا می‌گردد. البته افزودن لیپوپلی‌ساکارید (۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به عنوان محرک مونوسیت‌ها، این تحریک ترشح فاکتور نکروزدهنده آلفا را افزایش و یا کاهش نمی‌داد. افزایش ۸۰ میکرولیتر عصاره (معادل ۱۰ میلی‌گرم پودر گیاه در میلی‌لیتر) به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت تاثیری معادل ۱۰۰ نانوگرم لیپوپلی‌ساکارید در رهایی فاکتور نکروزدهنده آلفا از مونوسیت‌ها داشت. تاکسول به تنهایی، حتی تا دوز ۸۰ میکرومولار تاثیری معادل ۱۰۰ نانوگرم لیپوپلی‌ساکارید را در رهایی فاکتور نکروزدهنده آلفا نداشت. داده‌های این تحقیق نشان می‌دهد، تاکسول و عصاره آب الکلی گیاه سیاه گینه هردو قادر به افزایش ترشح فاکتور نکروزدهنده آلفا از مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت می‌شوند. این اثر مشابه تاثیر تاکسول بر ماکروفاژها می‌باشد (۸).

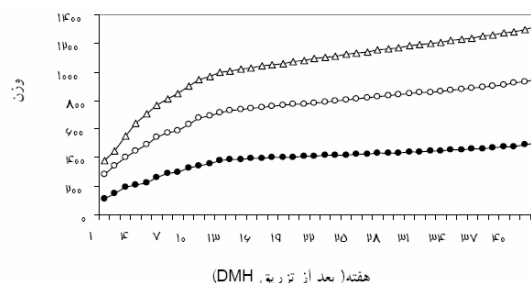
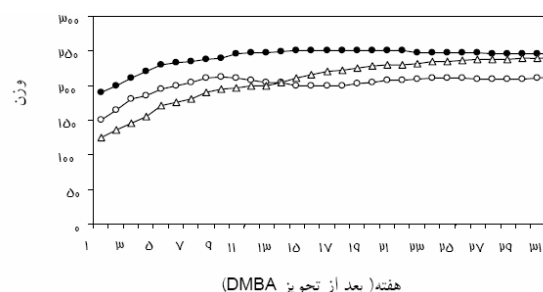


شکل ۳- تاثیر غلظتهای مختلف عصاره دندروستلرا لزرتهی (سیاه گینه) (الف) و غلظتهای مختلف تاکسول (ب) در رهایی TNF- α در حضور (■) و غیاب (□) ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید بر روی مونوسیت‌های انسانی

میلی‌لیتر عصاره، معادل ۰/۵ گرم پودر برگ گیاه) در زمان فوق به شدت کاهش و در مواردی پس از ۱۶ هفته کاملاً از بین رفت. نتایج گزارش شده در تصویر شماره ۲ نشان می‌دهد که مصرف آب و وزن رت‌ها در کلیه گروه‌ها مشابه بوده و تحت تاثیر عصاره گیاه تغییر نکرده است. از آنجایی که اثرات سمی خاصی با مصرف بلند مدت این عصاره مشاهده نشد و تاثیر قابل ملاحظه‌ای در کاهش و حتی از بین رفتن تومور پستان داشت، بررسی مکانیزم عمل این عصاره حایز اهمیت به نظر می‌رسید.

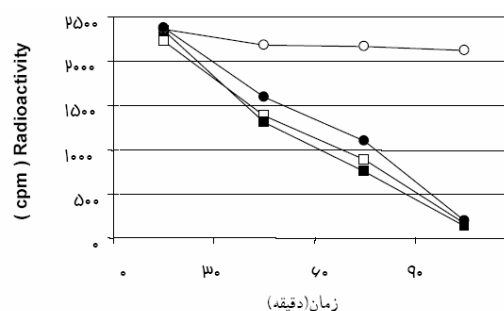


شکل ۱- تاثیر تجویز خوراکی عصاره گیاه بر تومور پستان رت. رت‌های دریافت‌کننده روزانه نیم میلی‌لیتر عصاره (●-●، ○-○، □-□، ■-■) و رت‌های دریافت‌کننده روزانه نیم میلی‌لیتر آب مقطر (▲-▲، △-△)



شکل ۲- تاثیر عصاره آب الکلی گیاه بر وزن رت‌ها با تجویز (الف) دی‌متیل‌بنزآنتراسن DMBA و (ب) تزریق دی‌متیل هیدرازین DMH. (■-■) گروه کنترل، (▲-▲) گروه کارسینوژن و (●-●) گروه دریافت‌کننده کارسینوژن و عصاره

اثر عصاره بر تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروزدهنده آلفا: تاثیر عصاره سیاه گینه بر تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروزدهنده آلفا بر روی مونوسیت‌ها در مقایسه با تاکسول بررسی شد. طبق تصویر شماره ۴ اتصال فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا به گیرنده‌هایش یا به عبارتی تعداد این گیرنده‌ها در مسیری وابسته به زمان در طی ۹۰ دقیقه به شدت کاهش می‌یابد. لذا این عصاره مانند تاکسول قادر به تنظیم کاهشی تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا می‌باشد. ماده موثر موجود در عصاره سیاه گینه که سبب افزایش رهایی فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا و تنظیم کاهشی گیرنده‌های آن بر سطح مونوسیت‌ها می‌گردد، جدا و تخلیص شد و بررسی ساختمان شیمیایی آن در دست انجام است.



شکل ۴- اثرات وابسته به زمان عصاره سیاه گینه بر تعداد گیرنده‌های فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا بر مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت. آب مقطر (○-○)، عصاره ۲۰ μL (□-□)، عصاره ۴۰ μL (●-●)، عصاره ۸۰ μL (■-■)

بحث

استفاده از گیاهان خانواده تیمه لاسه در درمان سرطانها سابقه طولانی دارد. از گونه منحصر به اقلیم ایران در این خانواده، می‌توان از دافنه ماکروناتا و دندروسیترا لزرتی (سیاه گینه) نام برد. با توجه به شیوع و اهمیت سرطانهای لوله گوارش و نیز پستان، در مطالعه پیشین پس از مشخص شدن تاثیر عصاره برگ گیاه دافنه ماکروناتا بر تومور پستان در رت، تاثیر این عصاره در افزایش ترشح فاکتور نکروز دهنده بافتی آلفا و تنظیم کاهشی گیرنده‌های این فاکتور بر سطح مونوسیت‌ها مشخص شد (۱۹). لذا عضو دیگر این خانواده گیاهی یعنی دندروسیترا لزرتی برای مطالعه مشابه انتخاب گردید. مطالعات اولیه تاثیر مثبت عصاره آب الکلی برگ این گیاه بر

کاهش اندازه تومورهای آدنوکارسینومای پستان و روده در رت را نشان داد. یکی از داروهای موثر در درمان برخی سرطانها، تاکسول می‌باشد. این ترکیب اولین بار از پوست درخت سرخدار استخراج شد. در بررسی مکانیزم مولکولی عملکرد این ترکیب دو مسیر اصلی گزارش شده است. در مسیر اول که به مسیر وابسته به چرخه سلولی معروف است، عملکرد این دارو به چرخه سلولی وابسته بوده و با تثبیت میکروتوبول‌ها مانع جدا شدن دوک تقسیم می‌شود. اما در مسیر دوم که مسیر مستقل از چرخه سلولی می‌باشد، عمدتاً از طریق سایتوکاین‌ها عمل می‌کند. مهمترین سایتوکاین در این خصوص فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا می‌باشد. این فاکتور عمدتاً از ماکروفاژها و مونوسیت‌های ترشح می‌گردد. البته این ترشح با محرکهای ماکروفاژی مانند لیپوپلی ساکاریدها افزایش نیز می‌یابد. در بررسی عملکرد عصاره دندروسیترا لزرتی، داده‌های این تحقیق نیز حاکی از افزایش رهایی فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا توسط مونوسیت‌های جدا شده انسانی در محیط کشت بود. با این تفاوت که لیپوپلی ساکارید تاثیر عمده‌ای در این افزایش رهایی نداشت. شاید پودر گیاه در طی مراحل آماده‌سازی و عصاره‌گیری به عوامل مشابهی آلوده شده و یا اصلاً خود حاوی موادی با اثر مشابه بوده است. از آنجایی که تعداد قابل ملاحظه‌ای از گیرنده‌های این فاکتور نکروزدهنده بر روی خود مونوسیت‌ها وجود دارد چرا افزایش رهایی آن توسط مونوسیت‌ها به خود مونوسیت‌ها آسیب نمی‌رساند؟ بررسی تعداد گیرنده‌های این فاکتور نکروزدهنده بر روی مونوسیت‌ها به کمک ردیابی لیگاند مربوطه با نشاندارسازی رادیواکتیویته حاکی از تنظیم کاهشی شدید این گیرنده‌ها بود. به عبارتی با افزایش رهایی فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا، سلولهای مولد یعنی مونوسیت‌ها، برای مکانیزم دفاعی، تعداد گیرنده‌های این فاکتور در سطح خود را به سرعت (کمتر از ۹۰ دقیقه) و به شدت در محیط کشت کاهش می‌دهند. لازم به ذکر است که ماده موثره در عصاره سیاه گینه که سبب افزایش ترشح فاکتور نکروزدهنده بافتی آلفا و کاهش تعداد گیرنده‌های آن بر سطح مونوسیت‌های انسانی در محیط کشت می‌گردد، جدا و خالص شده است و تعیین ساختمان شیمیایی آن در دست بررسی است. امید است با تعیین ساختمان مولکولی و بررسی عوارض جانبی آن بتوان بر مینای گیاهان بومی کشور خودمان به داروهای موثری در درمان برخی سرطانها دست یابیم.

REFERENCES

1. Abe F, Iwase Y, Yamauchi T, Kinjok K, Yaga S. Daphnane diterpenoids from the bark of *Winstromia etusa*. *Phytochem* 1977;44:643-6.
2. Baba K, Takeuchi K, Hamaski F, Kozawa M. Chemical studies on the constituents of the Thimelaeceous plants. *Thunb Chem Pharm Bull* 1986;34:595-8.
3. Kasai R, Lee K, Huang H. Antitumor agent 40. Genkawaphnin a potent anti-leukemic diterpene from *Daphne genkawa*. *Phytochem* 1981;20:2592-5.
4. Kupchan SM, Baxter RL. Mezerin: antileukemic principle isolated from *Daphne mezereum*. *Science* 1975;187:652-4.
5. Beatler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachepsin (tumor necrosis factor) synthesis, mechanism of endotoxine resistance. *Science* 1986;232:977-80.
6. Ding AH, Porteu F, Sanchez E, Nathan CE. Shared action of endotoxin and taxol on TNF-receptor and TNF release. *Science* 1990;248:370-3.
7. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin induced serum factor that cause necrosis tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3665-8.
8. Allen JN, Moore SA, Wewers NW. Taxol enhance but not induced IL-1 beta and TNF- α production. *Clin Res* 1992;40:744(Abstract).
9. Nagahira A, Nagahira K, Murafuji H, Abe K, Magata K, Matsui M et al. Identification of a novel inhibitor of LPS-induced TNF- α production with antiproliferative activity in monocytes/macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 2001;281:1030-6.
10. Meyer BN, Ferringne NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nicholas DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Medica* 1982;45:31-4.
11. Finney DJ. Probit analysis. 3rd edition. Cambridge, Cambridge University Press. 1971.
12. Clement IP. Ability of dietary fat to overcome the resistance of mature female rats to 7,12-dimethylbenzanethracene induced mammary tumornecrosis. *Cancer Res* 1980;40:2785-8.
13. Hussey HJ, Tisdale MJ. Metabolism and pharmacokinetic of the anti tumor agent 2, 3, 5 trimethyl-6-(3-pyridylmethyl) 1,4 benzoquinone. *Brit J Cancer* 1996;74:1379-82.
14. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of 131-I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem* 1963;39:114-8.
15. Bennett S, Berit SN. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J Leukoc Biol* 1994;56:236-40.
16. Almeida MC, Silva AC, Barral A, Netto MB. A method for human peripheral blood monocytes isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 2000;95(2):221-3.
17. Hedayati M, Yazdanparast R, Azizi F. Determination of human tumor necrosis factor alpha by a highly sensitive enzyme immunoassay. *Biochem Biophys Res Comm* 2001;289:295-8.
18. Losi E, Rossano F, Cusumano V, Mancuso G, Tomasello F, Chillemi S, et al. Effects of Taxol on TNF- α and IL-6 production by human peripheral blood cells. *Ann N Y Acad Sci* 1996;30(784):525-8.
19. Hedayati M, Yazdanparast R, Azizi F. Anti-tumor activity of *Daphne mucronata* extract and its effects on TNF- α receptors and TNF- α release in cultured human monocytes. *Pharmaceut Biol* 2003;41(3):194-8.