بررسی اثرات سمیت سلولی ماده شیمگین (Tschimgine) بر روی رده ای از سلول های سرطان مثانه در شرایط *in vitro*

فاطمه رونقی [۱]، مریم مقدم متین [۱و۲]، مهرداد ایرانشاهی [۳]، احمد رضا بهرامی [۱و۲]

۱-گروه پژوهشی سلولی و ملکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

سرطان مثانه یکی از معمول ترین سرطان ها در سراسر دنیا می باشد و در این بین کارسینومای سلول های ترانزیشنال (TCC) رایج ترین نوع سرطان مثانه است که نسبت به شیمی درمانی مقاومت نشان می دهد. سلول های ۵۶۳۷ نمونه ای سلول های از TCC می باشند که سلول های شبه اپیتلیالی بوده و بیش از ۹۰ درصد سلول های سرطانی مثانه را تشکیل می دهند.

در پژوهش حاضر، اثرات سمیت سلولی ماده شیمگین (Tschimgine) بر روی سلول های سرطانی ۵۶۳۷ مورد بررسی قرار گرفت. شیمگین از مشتقات مونو ترپن ها بوده و از ریشه گیاه *Ferula ovina* خالص سازی شده. بدین منظور غلظت های مختلفی از ماده مذکور بر روی سلول های سرطانی و نیز سلول های فیبروبلاست نرمال انسانی (HFFF2) اثر داده شد. به علاوه ، سلول های ۵۶۳۷ با غلظت های مشابهی از DMSO که حلال ماده شیمگین بوده و به عنوان کنترل تیمار شدند. سپس ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول ها، تغییرات مورفولوژیکی آنها با استفاده از میکروسکوپ معکوس و میزان مرگ و میر و نیز تعیین دوز و زمان مناسب سمیت ماده مذکوربه کمک تست MTT مورد بررسی قرار گرفت.

مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول های سرطانی بعد از تأثیر ماده مذکور در مقایسه با سلول های کنترل منفی، تغییر مورفولوژی داده و گرانوله و کروی شدند.محاسبات نشان دادند که بیشترین میزان مرگ ومیر سلولی ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول های TCC با غلظت g/ml ۴۰ و برای سلول های فیبروبلاست نرمال انسانی با غلظت g/ml ۶۴ حاصل گردید.

با توجه به نتایج حاصل می توان ماده شیمگین را به عنوان گزینه ی احتمالی مناسب جهت کاهش و مرگ سلول های سرطانی در انسان در نظر گرفت.

واژه های کلیدی : Tschimgine، سلول های ۵۶۳۷، سمیت سلولی، *Ferula ovina*

مقدمه:

سرطان نام عمومی بیش از صد بیماری است که در آن سلول های بخش هایی از بدن، بصورت کنترل نشده تقسیم شده و رشد می کنند و سالانه درصد بالایی از مرگ و میر را به خود اختصاص می دهد (۱).

تقریبا اکثر سرطان ها به علت یک ناهنجاری و یا اختلال در عملکرد ماده ژنتیکی رخ می دهند که فرد این DNA جهش یافته را بصورت ارثی و یا تحت تاثیر عوامل محیطی نظیر اشعه، ویروس ها و باکتری ها، مواد شیمیایی، رژیم غذایی نامناسب، دود سیگارو نظایر اینها دریافت می کند (۲).

روشهای زیادی برای درمان سرطان به کار برده می شوند که از آن جمله شیمی درمانی، اشعه درمانی، جراحی، ژن درمانی، هورمون درمانی، ممانعت از رگ زایی و... می باشند (۱). به همین منظور داروهای زیادی هم مورد آزمایش قرار گرفته اند که بیش از نیمی از آنها از گیاهان استخراج شده اند (۲). درگذشته برای بررسی خاصیت سیتوتوکسیک یک دارو آن را بر روی مدل های حیوانی آزمایش می کردند. اما با افزایش میزان این داروها وهزینه بالای مدل های حیوانی وتاخیر در پاسخ به دارو در این مدل ها وهمچنین تفاوتهای متابولیک بین انسان و مدل حیوانی نظیرموش، امروزه اغلب ازکشت سلول برای این منظور استفاده می شود (۲).

به عنوان مثال برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک داروها می توان از سلول های مشتق شده از سرطان مثانه مثل TCC (Transitional Cell Carcinoma) استفاده کرد. سلول های 5637 نمونه ای از این سلول ها می باشند که سلول های شبه اپیتلیالی بوده و بیش از ۹۰ درصد سلول های سرطانی مثانه را تشکیل می دهند (۳).

هدف از این کار پژوهشی بررسی اثرات سیتوتوکسیک ماده شیمگین (Tschimgine) بر روی سلولهای سرطانی می باشد. شیمگین از مشتقات مونوترپنها بوده و ازریشه گیاه *Ferula ovina* استخراج شد. (۴).

جنس *Ferula* از جمله جنسهای پرجمعیت خانواده چتریان می‌باشد که بالغ بر ۱۳۰ گونه و طبق برخی منابع تا ۱۸۰ گونه در دنیا دارد (۵). این گونه‌ها عمدتا در آسیای میانه، شوروی سابق، ایران، افغانستان، ترکیه و چین وجود دارند. ۳۰ گونه از این جنس از ایران گزارش شده است (۶).

مواد و روش ها :

۵۰۰ گرم پودر خشک ریشه گیاه به وسیله ۳ لیتر حلال دی کلرومتان به مدت ۳۶ ساعت با روش خیساندن عصاره گیری شد. وزن عصاره تغلیظ شده معادل ۹۳ گرم بود. ترکیبات ۲۱ گرم از این عصاره با استفاده از ستون کروماتوگرافی با فاز ثابت سیلیکاژل خالص سازی گردید. در پایان ۳ ترکیب خالص بدست آمد که شیمگین از جمله آنها بود. با انجام آزمون TLC و همچنین طیف های NMR تهیه شده از ترکیبات ذکر شده، مشخص گردید که خلوص مناسبی داشته و نیازی به خالص سازی بیشتربا روش های کروماتوگرافی صفحه نمی باشد.

سلول های 5637 وسلول های فیبروبلاست نرمال انسانی (HFFF2) در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو کشت داده شدند. سپس تعداد معینی از این سلول ها در فلاسک های کشت سلول ۹۶ خانه ای کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، سلول های سرطانی با غلظت های (g/ml ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴) و سلول های فیبروبلاست نرمال انسانی با غلظت های(g/ml ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و۱۲۸) ماده شیمگین تیمار شدند.

علاوه بر این، سلول های مذکور با غلظت های مشابهی از DMSO به عنوان حلال ماده شیمگین و نیز کنترل آزمایش تیمار گردیدند.

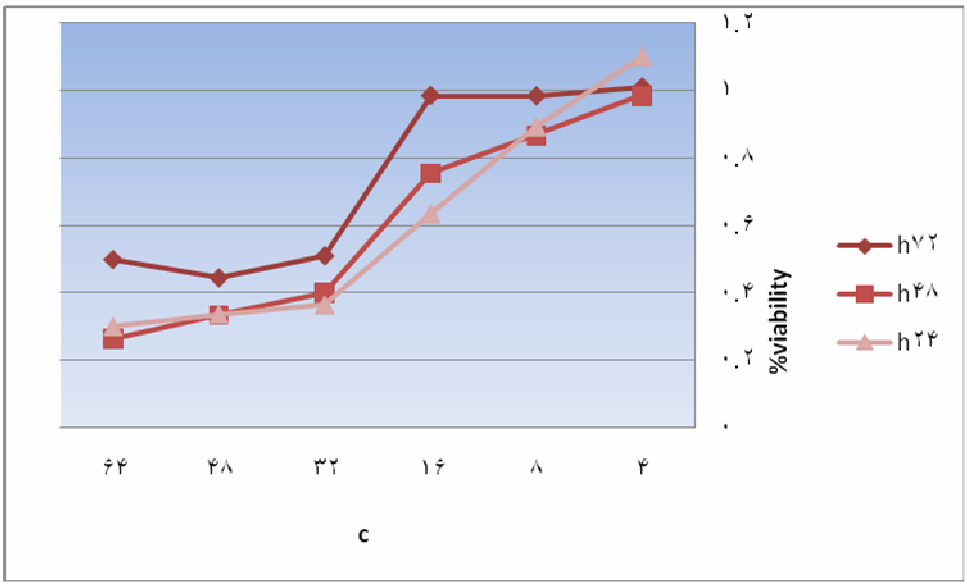
میزان مرگ و میر این سلول ها طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با استفاده از تست MTT ارزیابی شد . در این روش مقدار۲۰ l محلول MTT، که از حل نمودن ۵ mg پودر MTT در ۱ ml محلول PBS و فلیتر نمودن آن تهیه می شود، به هر خانه اضافه گردید و سلول ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از اتمام ۴ ساعت، محتویات هر یک از خانه های فلاسک با ۱۵۰ l محلول DMSO جایگزین شد که نتیجه آن تولید محلول بی رنگ یا بنفش رنگ با

شدت رنگ های متفاوتی بود. سپس جذب نوری هر خانه، که معیاری از تعداد سلول ها ی زنده می باشد، با دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۵ nm اندازه گیری شد.

نتیجه گیری و بحث :

مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول های سرطانی بعد از تأثیر ماده مذکور در مقایسه با سلول های کنترل منفی، تغییر مورفولوژی داده و گرانوله و کروی شدند. نتایج تست MTT نیز مشاهدات میکروسکوپی را تأیید نمود.

محاسبات نشان دادند که بیشترین میزان مرگ ومیر سلولی ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول های ۵۶۳۷ با غلظت ۴۰ g/ml و برای سلول های فیبروبلاست نرمال انسانی با غلظت ۶۴ g/ml حاصل گردید.



با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می توان ماده شیمگین را به عنوان گزینه ی احتمالی مناسب جهت کاهش و مرگ سلول های سرطانی در انسان در نظر گرفت چرا که این ماده در غلظت های پایین فاقد اثرات سمی می باشد. به علاوه شیمگین دارای منشأ گیاهی بوده و اثرات جانبی احتمالی کمتری نسبت به دارو های معمول درمان سرطان خواهد داشت.

منابع :

1- Teicher,B., Andrews ,P.A. (2004) Anticancer drug development guide: preclinical screening clinical trials, and approval. *Humana Press*, 2:4-6.
2- Gallucci, B. B. (1985) Selected concepts of cancer as a disease. *Oncol Nurs Forum*, 12: 67-71.
3- Behnam Rassouli, F., Matin ,M. M., Iranshahi, M., Bahrami, A. R., Neshati, V., Mollazadeh, S., Neshati, Z. (2009) Mogoltacin enhances vincristine cytotoxicity in human transitional cell carcinoma (TCC) cell line. *Phytomedicine.*, 16: 181-187.
4-Ikeda, K., Arao, Y., Otsuka, H., Nomoto, S., Horiguchi, H., Kato, S., Kayama, F. (2002) Terpenoids found in the umbelliferae family act as agonists/antagonists for ERα and ERβ: differential transcription activity between ferutinine-liganded. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291: 354–360.
5-Pimenov, M. G., Leonov, M.V. (2005) The asian umbelliferae biodiversity database (ASIVM) with particular reference to south – west asian taxa. *Turkish Journal of Botony*, 28: 139-145.
6. Mozaffarian, V. (2003) A dictionary of Iranian Plant Names. *Farhang Moaser*. Tehran, 3: 228-229.

Investigating the cytotoxic effects of Tschimgine in 5637 cells *in vitro*

Maryam M. Matin[1,2], Mehrdad Iranshahi[3], Ahmad Reza Bahrami[1,2], Fatemeh Ronaghi
[1] Institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhd, Mashhad, Iran.
[3] Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Biotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Abstract
Urinary bladder cancer is one of the most common cancers worldwide. TCC of the bladder is the second most common type of urological malignancy. These tumours are relatively resistant to most of chemotherapy agents. 5637 is a sub-line of TCC cells which was used in this research.
In this study, the cytotoxic effects of Tschimgine in 5637 cells as an *in vitro* model for bladder cancer study were investigated.
5637 and HFFF2 Cells were treated with different concentrations of Tschimgine and DMSO. After 24,48 and 72 h Cell viability was quantitated by MTT assay and cells were observed for morphological changes by light microscopy.
Cells were more rounded and granulated after treatments with agents in comparison to controls.
Results revealed that after 48 hours of treatment the 5637 cells with 40µg/ mL Tschimgine and 64 µg/ mL for HFFF2 cell, the most cell death was observed.
It might be concluded that Tschimgine could cause tumor cell death.

Keywords: Tschimgine, 5637 cells, Cytotoxicity, *Ferula ovina*