بررسی اثرات سمیت سلولی منوترپنوئید فروتینین بر روی سلول های سرطان پستان و تراتوکارسینوما

حسین نخعی زاده*[1]، مریم مقدم متین[1,2]، احمد رضا بهرامی[1,2]،مهرداد ایرانشاهی[3]، فاطمه بهنام رسولی[1] ، مروارید ساعی نسب[1]
۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، پست الکترونیک: Hosein_nakhaeizadeh1348@yahoo.com

۲گروه پژوهشی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳مرکز تحقیقات فناوری زیستی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

مقدمه: اگرچه شیمی درمانی یک روش کارآمد در درمان بدخیمی هایی همچون سرطان پستان و تراتوکارسینوما محسوب می شود، اما مقاومت داروئی سلول های سرطانی به داروهای تجویز شده اصلی ترین مانع در درمان این بیماری ها محسوب می شود.

هدف: هدف از این پژوهش بررسی اثرات سمیت سلولی فروتینین، منوترپن مستخرج شده از *Ferulla ovina* بر روی سلول های سرطان پستان (MCF7) و سلول های کارسینومای شبه جنینی (NTERA2) می باشد.

روش ها: برای تعیین IC_{50} فروتینین، سلول های MCF7 و NTERA2 با غلظت های متفاوتی از فروتینین شامل غلظت های۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شده و سپس زنده ماندن سلول ها بوسیله تست MTT در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بررسی ها نشان داد که IC_{50} فروتینین بر روی سلول های MCF7 پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب 38، 32 و 29 میکروگرم بر میلی لیتر بود. علاوه بر این فروتینین اثرات سمی خود را بر روی سلول های NTERA2 در غلظت های 17، 16 و 14 میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال کرد. جالب اینکه مشاهدات مورفولوژیک نیز اثبات کردند فیروتینین قادر است اثرات سمی خود بر هر دو رده سلولی را، که به صورت گرانولاسیون های سیتوپلاسمی قابل مشاهده بودند، تنها پس از گذشت ۹۰ دقیقه اعمال کند. با توجه به اثرات سمی چشمگیر فروتینین می توان از آن در مطالعات *in vivo* و کلینیکی آینده استفاده کرد.

واژه های کلیدی: فروتینین، سمیت سلولی، سرطان پستان، *Ferulla ovina*

مقدمه: بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی بعد از بیماری های قلبی عروقی، سرطان دومین عامل مرگ ومیر در جهان محسوب می شود که مرگ و میر بالایی را به خود اختصاص داده است. در بین انواع مختلف سرطان ها، بدخیمی های پستان شایعترین عامل مرگ و میر در میان زنان میانسال محسوب می گردد(1).

برای درمان سرطان روش های متعددی از جمله شیمی درمانی، پرتودرمانی، جراحی، هورمون درمانی و یا ترکیبی از این روش ها استفاده می شوند (2). با وجودی که شیمی درمانی خصوصا در سرطان های متاستاز دهنده یک روش موثر درمانی محسوب می شود، اما مقاومت ذاتی و اکتسابی در برابر داروهای شیمیایی مانع بزرگی در استفاده از این داروها می باشد (3). بنا براین نیاز به داروهای جدید همواره وجود داشته و محققان در سراسر جهان تلاش گسترده ای را در جهت شناسایی ترکیبات جدید طبیعی یا سنتزی با خواص ضد سرطانی معطوف داشته اند.

گیاهان جنس رازیانه (*Ferula*) متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) هستند و به فراوانی در منطقه خاورمیانه و کشورهایی از جمله ایران یافت می شوند (4). گونه های متعلق به جنس رازیانه به عنوان منابعی غنی از ترکیبات فعال زیستی همچون مشتقات ترپنی و کومارینی محسوب می شوند (5) و به دلیل دارا بودن خواص ضد تشنجی و ضد میکروبی به فراوانی در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می گیرند. هدف از این پژوهش بررسی اثرات سمیت سلولی فروتینین، منوترپن مستخرج شده از *Ferulla ovina* بر روی سلول های سرطان پستان (MCF7) و سلول های (NTERA2) می باشد.

مواد و روش ها:

گیاه *Ferula ovina* از ارتفاعات بینالود جمع آوری شده و در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد مورد شناسایی قرار گرفت (شماره شناسایی ۱۰۱۱). سپس عصاره دی کلرومتانی از ریشه گیاهان جمع آوری شده به روش خیساندن تهیه و حذف حلال گردید. به منظور انجام کروماتوگرافی ستونی، ۲۰ گرم از عصاره حاصل بر روی ستونی از سیلیکاژل قرار گرفت و شستشوی ستون با حلال های اتردوپترول و اتیل استات منجر به جداسازی ترکیبات قطبی و غیر قطبی گردید. درجه خلوص این ترکیب با استفاده از آزمون TLC و تهیه طیف های NMR یک و دو بعدی کنترل و مشخص گردید این ماده دارای درجه خلوص بالایی می باشد.

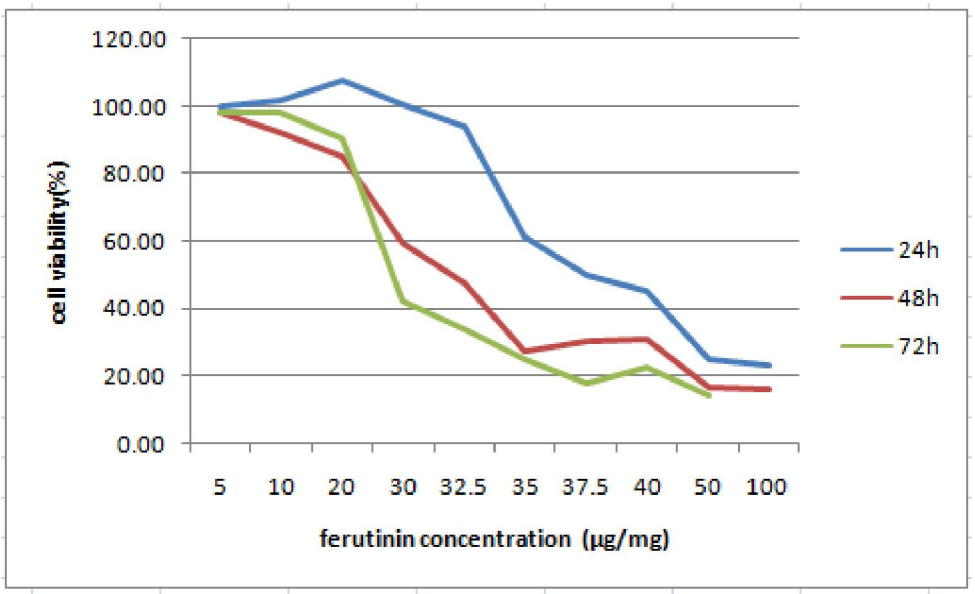
تعداد ۸۰۰۰ سلول MCF7 و NTERA2 در هر خانه فلاسک ۹۶ خانه ای در محیط کشت سلولی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو کشت داده شدند و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۰ درصد $C0_2$ انکوبه شدند. برای تعیین غلظتی از فروتینین که باعث مرگ نیمی ازسلول ها می شود (IC_{50})، سلول های MCF7 با غلظت های متفاوتی از فروتینین (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۳۲.۵ ، ۳۵، ۳۷.۵، ۴۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و سلول های NTERA2 با غلظت های افزایش یابنده ای از این مونوترپن (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تیمار شده و علاوه بر این هر ۲ رده سلولی با غلظت مشابهی از DMSO، که جهت حل نمودن فروتینین استفاده شده بود، به عنوان کنترل تیمار شدند. سپس زنده ماندن سلول ها بوسیله تست MTT در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای انجام تست MTT ابتدا محلول تترازولیوم با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و پس از فیلتره کردن به هر خانه از فلاسک ۹۶ خانه ای حجم ۲۰ میکرو لیتر از آن اضافه و ۴ ساعت در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، که طی آن از متابولیزه شدن ماده تترازولیوم در سلول های زنده بلورهای بنفش رنگ فورمازان تشکیل شدند، محتویات هر خانه با ۱۵۰ میکرولیتر DMSO جایگزین و به دنبال آن محلول های بنفش رنگی با شدت های رنگ گوناگون ایجاد شدند. میزان جذب نوری هر خانه، که معیاری از زنده ماندن سلول ها می باشند، با دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید.

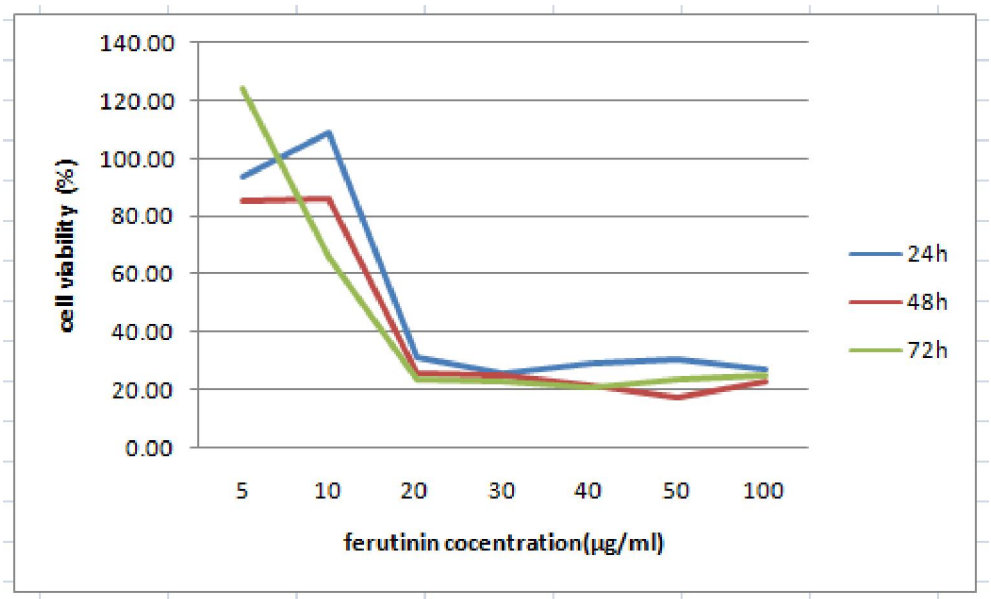
نتایج و بحث:

بررسی میزان زنده ماندن سلول ها نشان داد که IC_{50} فروتینین بر روی سلول های MCF7 پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب 38، 32 و 29 میکروگرم بر میلی لیتر بود (شکل ۱). علاوه بر این فروتینین اثرات سمی خود را بر روی سلول های NTERA2 در غلظت های 17، 16 و 14 میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال کرد (شکل ۲). جالب اینکه مشاهدات مورفولوژیک نیز اثبات کردند فیروتینین قادر است اثرات سمی خود بر هر دو رده سلولی را، که به صورت گرانولاسیون های سیتوپلاسمی قابل شناسایی بودند، تنها پس از گذشت ۹۰ دقیقه اعمال کند (شکل ۳).

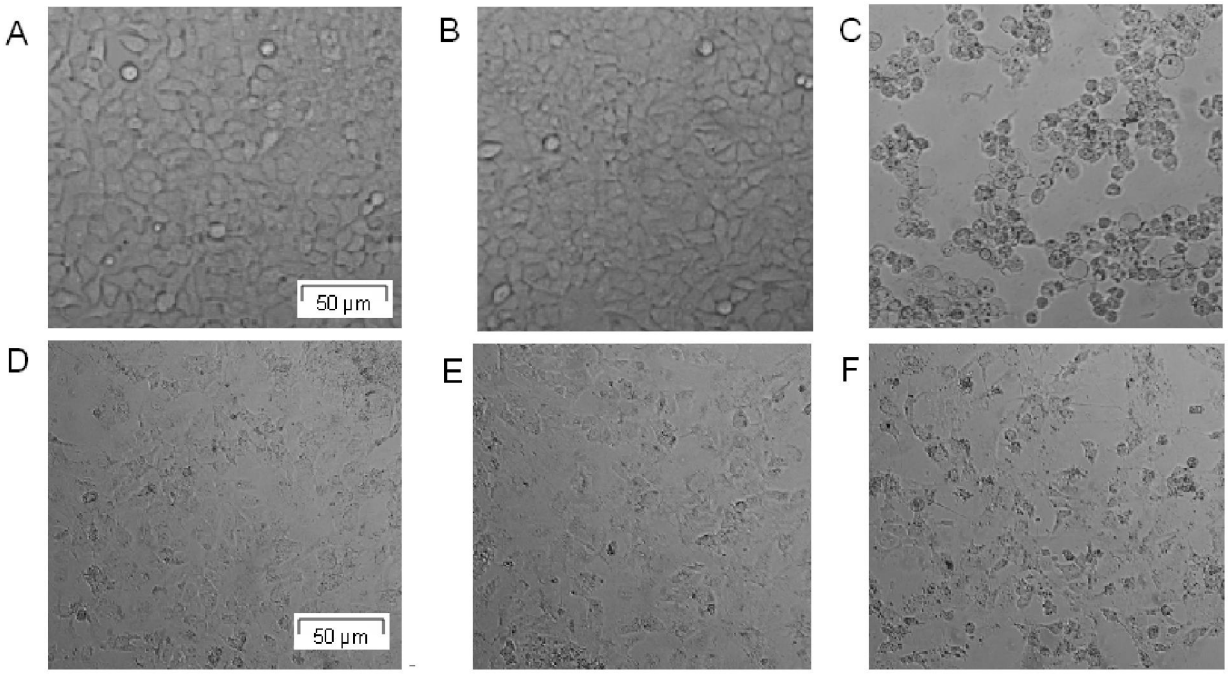
با توجه به نتایج بدست آمده می توان فروتینین را به عنوان ماده ای در نظر گرفت که دارای خاصیت کشندگی سلول های سرطانی بوده وبا توجه به اینکه در مدت زمان کوتاه اثر بخش بوده و اثر خود را در مدت طولانی نیز حفظ می کند با مطالعات بیشتر احتمالا می توان از آن به عنوان یک ترکیب ضد سرطانی استفاده نمود.



شکل ۱: منحنی دوز پاسخ حاصل از تیمار سلول های MCF7 با غلظت های گوناگون ترکیب فروتینین طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.



شکل۲: منحنی دوز پاسخ حاصل از تیمار سلول های NTERA2 با غلظت های گوناگون ترکیب فروتینین طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپی از سلول های MCF7 و NTERA2. سلول های تیمار نشده (A و D)، ۲ ساعت پس از تیمـار بـه میـزان ۰.۱۹٪ (B) و 0.085٪ (E) محلول DMSO و ۲ ساعت پس از تیمار با غلظت های ۳۸ µg/mL (C) و ۱۷ µg/mL (D) ماده فروتینین.

تشکر و قدردانی:

با سپاس فراوان از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور که ما در اجرای این پژوهش طی طرح شماره ۸۹۰۰۱۵۱۶ یاری نمودند.

منابع:

1-http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en

2- **Tiecher , B ., Andrew , P. A .2004**. Anticancer drug development guide: preclinical screening clinical trials , and approval . Humana Press , 2: 4-6.

3- **Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D. 1998**. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 15665–15670.

4- **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.

5- **Ahmed A.A., Abd El-Razek M.H., Nassar M.I., Izuma S., Ohta S., Hirata T. 2001**. Sesquiterpene coumarins from the roots of Ferula assa-foetida. Phytochemistry 58: 1289- 1295.

Investigating the cytotoxic effects of monoterpenoid ferutinin on breast cancer cells

Hossein Nakhaii Zadeh*[1], Maryam M. Matin[1,2], Ahmad Reza Bahrami[1,2], Mehrdad Iranshahi[3], Fatemeh Behnam Rasuli[1], Morvarid saeinasab[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Email address: Hosein_nakhaeizadeh1348@yahoo.com

[2]Cell and Molecular Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

[3]Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Introduction: Although chemotherapy is an effective way for treatment of breast cancer. But intrinsic or developed resistance to cancer chemotherapeutic agents is the main barrier to successful treatment of this malignancy. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effects of ferutinin, a monoterpenoid from *Ferula ovina*, on MCF7 (human breast adenocarcinoma cell line) and NTERA2 cells.

Methods: To determine the (IC_{50}) of ferutinin, MCF7 and NTERA2 cells were treated with different concentrations (5, 10, 20, 30, 40,50 and 100 µg/ml) of ferutinin. The viability of cells was then evaluated by MTT assay after 24, 48 and 72 hours.

Results: Analysis of cell survival showed that the IC_{50} values of ferutinin on NTERA2 cells were ۱۷, ۱۶ and 14 µg/ml after 24, 48 and 72 h of treatment, respectively. Furthermore, ferutinin induced its toxic effects on MCF7 cells at 38, 32 and 29 µg/ml after 24, 48 and 72 h of its administration, respectively. Morphological observations confirmed the effects of ferutinin on both cell lines.

Further studies are required to determine the effects of this compound on other cell lines and also to check its *in vivo* effects in animal models.

Key words: *Ferula ovina*, Ferutinin, Cytotoxicity, Breast cancer.