بررسی تاثیرعصاره تریگونلا فوئنوم(شنبلیله) برمرگ سلولی در اثر تابش درسلولهای لنفوسیت T خون

علی کیانی دانشگاه صنعتی مالک اشتر مجتمع علوم کاربردی گروه فیزیک بهداشت
:

خلاصه:

زمینه: موادی که بر سیستم ایمنی اثرقابل ملاحظه بگذارند می توانند تاثیر عوارض ناشی از پرتو بر بافتهای سالم وسرطانی را کنترل کنند.

روشها:در این تحقیق سلول های T در یک محیط کشت که به آن عصاره شنبلیله اضافه شده بود تابش داده شدند. سپس مرگ برنامه ریزی سلولها در اثر تابش با فلوسایتومتری چند رنگی اندازه گیری شد.

نتیجه گیری و بحث: یک افزایش واضح در مرگ برنامه ریزی شده ایجاد شده با پرتو در لنفوسیت های T بعد از اضافه شدن عصاره شنبلیله به محیط کشت اتفاق افتاد($P<0.05$)

لغات کلیدی: داروی گیاهی ، مرگ سلولی ، تابش رادیو اکتیو، فلوسایتومتری، لنفوسیت ها، تریگونلا فوئنوم

مقدمه:

مرگ برنامه ریزی شده یا مرگ اینترفازی سلول یک پروسه طبیعی فیزیولوژیک است تا سلولهای غیر مورد نیاز را حذف کند ودر بافت سالم هموستئاز را تامین کند. دانشمندان پیشنهاد کرده اند که مرگ برنامه ریزی شده و تعادل زاد و ولد سلولی رشد تومور را تنظیم میکنند. بیشتر روشهای درمان سرطان با ایجاد مرگ برنامه ریزی شده برسلول های بد خیم آنها را ازبین میبرند(۱).تابش یونیزان با خسارت به سلولهای زنده وسرطانی از طریق رادیکالهای آزاد آبی که در اثر بر هم کنش تابش با آب تولید می شوند باعث قطع فعالیت های سلولی و مرگ می شوند(۲،۳). خسارت پرتوی به یک سلول بسته به فاکتورهای مختلف مثل حضور اکسیژن ، ترکیبات سولفیدریل ، آنزیم ها ویا بعضی اجزائ گیاهی در محیط سلولی تضعیف و یا تقویت می شود(۲). در ایران ،هند چین وسایر کشورها نه تنها به عنوان غذا و ادویه بلکه از گیاهان برای درمان بسیاری از بیماریها استفاده می شده است.در سالهای اخیرا درمانهای گیاهی درهمه نواحی سریعا گسترش می یابد. با اینحال شواهدعلمی که ایمنی و مفید بودن آنها را ثابت کند به اندازه کافی وجود ندارد(۴). در بین سلول های ایمنی سلول های T مهمترین در نظر گرفته می شوند. علایق پژوهشی بر رو ی گیاهانی که خواص تغییرایمنی دارند تمرکز کرده شایدکه در کاهش ریسک انواع بیماریهای سیستم ایمنی و سرطان مفیدباشند(۵). تریگونلا فوئنوم در سرتاسر در جهان کاشته می شود ود ر فارسی به آن شنبلیله گفته می شود ونیز در بسیاری از مناطق جهان به عنوان داروی گیاهی

استفاده می شود(۱۲و۲۴و۲۵). این تحقیق قصد دارد تا اثر عصاره شنبلیله را بر روی مرگ برنامه ریزی شده سلول توسط پرتوگامای کبالت ۶۰ در سلول های T خون محیطی بررسی کند(۶،۷).

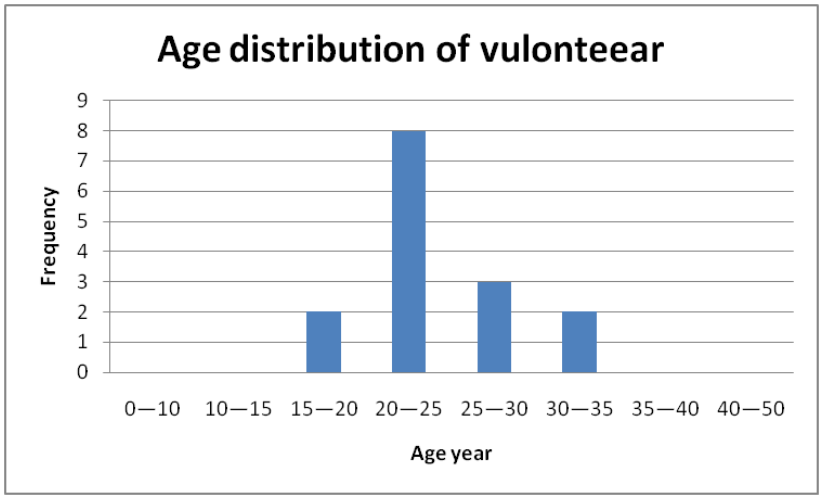
مواد وروشها

این تحقیق با در نظر گرفتن تمام جنبه های اخلاق پزشکی و طبق روشهای استاندارد مستند شد. عصاره از فروشگاههای معتبر محلی خریداری جوشانده شد وبا اتوکلاو خشک استرلیزه شد وبا یک روش استرلیزه سرد شد و قبل از برنامه تابش دادن سلولها به محیط کشت سلولی اضافه شد. کشت سلولی و تابش با روش استانداردی که در گزارش تکنیکی IAEA توضیح داده شده انجام شد. بعد از خونگیری از داوطلبان خون با نسبت ۱:۱ با PBS رقیق شد و لنفوسیت های آن با روش سانتریفوژ گرادیان چگالی با استفاده ازمحلول فایکل جدا شد(۸). سلول های جدا شده به محیط کشت RPMI که با FBS وگلوتامین وآنتی بیوتیک ها و PHA به عنوان تشدید کننده میتوز درسلولهای T تقویت شده بود اضافه شدند. سلولهای کشت داده شده در اتمسفر ۵٪ CO2 و دمای ۳۷ c تا زمان تابش دادن انکوبه شدند. در طی ده روز بعد سلولها به اندازه کافی برای انجام برنامه تابش تکثیر شده بودند.

برای تابش دادن هر سوسپانسیون سلولی نمونه به ۵ قسمت تقسیم شد و در داخل یک ظرف کشت ۶ خانه ریخته شد. عصاره گیاهی در پنج غلظت به هر ظرف کشت اضافه شد. ظروف نمونه ها در یک ظرف (فانتوم) با مواد معادل بافت با دستگاه رادیوتراپی کبالت ((TheratronPhonixOttavaCanada) در بخش رادیوتراپی بیمارستان سیدالشهدا اصفهان تایش داده شدند ودوباره در شرایط کشت استاندارد قرارداده شدند. تابش با نرخ دوز ۸۲,۴۶ cGy/min بر دقیقه برای دوز ۲Gy دوز تابش گاما ی دستگاه کبالت انجام شد. دزیمتری فیزیکی با استفاده از یک دریمتر اتافک گازی (Farmer 2570 Nuclear Enterprises, Zurich, Switzerland) وباپروتکلهای استاندارد انجام شد(۸).) بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سوسپانسیون سلولی لنفوسیت ها طبق یک پروتکل استاندارد جدا شدند. بعد ازجداسازی ،سلولها دربافر فسفات(Becton-Dickinson) که ۵ µl از محلول استوک PI به آن اضافه شده بود قرارداده شدند تاDNA رارنگ آمیزی شود وبرای ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پروتکل آنکسین بر حسب توصیه های سازنده کیت انجام شد. سپس سلولها با فلوسایتومتری سنجیده شدند ودرصد سلولهای درحال مرگ د اثر اعمال تعیین شد.

نتایج

خون کامل و نمونه هایPBLCs (لنفوسیت های خون محیطی)از ۱۵ اهدا کننده سالم بدست آمد. اهدا کنندگان هیچ سابقه رادیوتراپی و تماس پیوسته با عوامل شیمیایی وفیزیکی نداشتند. **توزیع سنی داوطلبان از یک توزیع نرمال** پیروی میکند.



rشکل ٤ توزیع سنی اهدا کنندگان خون

استفاده شد. نمونه در پنج گروه برای دز های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، و ۴۰ µg /ml از عصاره تریگونلا که جداگانه به چاهک های یک پلیت ۶ چاهک که حاوی نمونه ای سلولی بود اضافه شد. هرنمونه برای دز صفر و دز ۲ Gy از تابش گامای کبالت ۶۰ مورد تابش قرار گرفت. قبل از اندازه گیری مرگ برنامه ریزی شده زمینه بدون عصاره داروی گیاهی و بدون تابش در محیط کشت اندازه گیری شد. مقدار میانگین این اندازه گیری از تمام اندازه گیری ها کسر شد.میانگین و انحراف معیار در صد مرگ سلولی بدون تابش وبا اعمال دز ۲Gy تابش در جدول ۲ ارائه گردیده است.

جدول ۲) درصد مرگ سلولی زمینه بدون عصاره گیاهی

Radiation dose	0Gy	2Gy
average	4.81	10.875
STED	1.40	2.80

عصاره گیاهی درست ۱ ساعت قبل از برنامه تابش دادن به محیط اضافه شد. تعدادی از سلولها بدون عصاره تابش را دریافت کردند تا نرخ خالص مرگ سلولی در اثر تابش بدست آید. هر پلیت ۶ خانه سلولی با گامای کبالت تا ۲Gy تابش داده شد. محتویات هر خانه پلیت به لوله های جداگانه منتقل شد تا برای اندازه گیری مرگ سلولی در اثر تابش بافلوسایتومتری با انکسین V آماده شود (شکل ۵). در هر نوبت اندازه گیریری نتایج با مشاهده میکروسکپی تایید شد.نتایج اندازه گیری درصد مرگ سلولی بعد ازاعمال ۲Gy تابش با دز های مختلف دارو در جدول ۳ ارائه شده است.

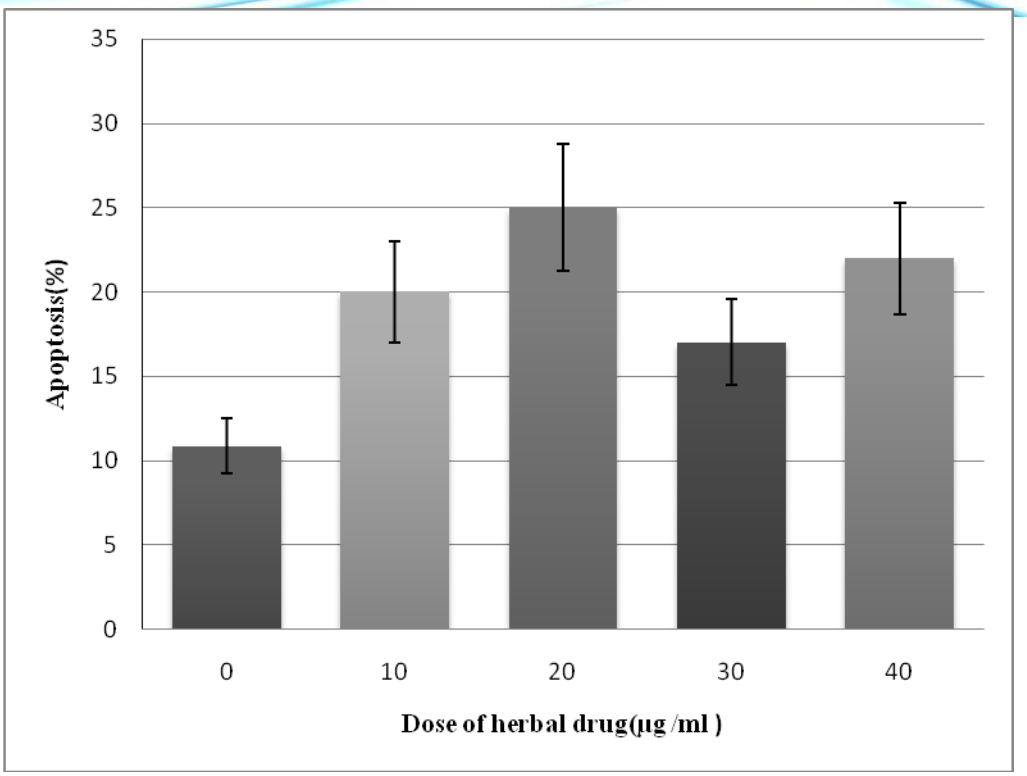
جدول ۳) میانگین در صد مرگ سلولی بعد از اضافه شدن عصاره گیاهی به محیط کشت

Drug dose (µg/ml)	0	10	20	30	40
Average Apoptosis(%)	10.85714	20	25	17	22
STDE	1.52	3.26	3.72	2.41	3.42

بحث:

بر ر سی رابطه سن ونرخ مرگ سلولی با محا سبه ضریب همب ستگی بین نرخ مرگ سلولی بعد از اعمال ۲Gy تابش ورسن در نمونه هایی که از آنها خون گرفته شده بود نشان داد که بین سن نمونه ها ومرگ سلولی در اثر تابش همبستگی وجود ندارد.

افزایش معنی دار وقابل ملاحظه ای در نرخ مرگ سلولی (۸۰٪) بین سلولهایی که در محیط کشت انان عصاره گیاهی وجود داشت و سلولهایی که درمحیط کشت انان عصاره داروی گیاهی وجود نداشت دیده می شود. آزمون T-TEST نشان داد که این اختلاف کاملا معنی دار است($P<0.03$). به این ترتیب نتیجه گیری می شود در حضور عصاره گیاهی نرخ مرگ سلولی افزایش میابد. اما تغییر غلظت از ۱۰ تا ۴۰ میکرو گرم بر میلی لیتر باعث افزایش معنی داری در نرخ مرگ ومیر سلولی نمی شود($P>0.05$). این نتیجه نشان می دهد که غلظت های مورد استفاده لا اقل در این تحقیق باعث افزایش بیشتر مرگ ومیر نمی شود. و بنظر می رسد اثر غلظت در مرگ سلولی در اثر تابش باید در غلظت های کوچکتر بررسی شود.



شکل۵) نرخ سلولی غلظت داروی وابستگی مرگ مقدار عصاره گیاهی انکسین v پیوند شده با یک شناخته خوب مرگ ریزی سلول FITC مارکر شده برای برنامه شده وشاید

احتمالا برای نشان دادن مسمومیت پرتوی در بیماران رادیو تراپی و قربانیان در حوادث پرتوی می باشد(۳و۴). اما پیوند انکسین با لنفوسیت های خونی با افزایش زمان نگهداری در محیط سلولی افزایش می یابد لذا تاثیر مثبت کاذب بر نتایج اندازه گیری مرگ سلولی دارد(۴). به علاوه تاخیر در اندازه گیری نرخ مرگ سلولی بعد از اعمال تابش اثر کاذب مثبت بر نتایج اندازه گیری دارد(۹).

این وابستگی های زمانی نرخ مرگ ومیر تفاوت بین نتایج اندازه گیری مختلف را غیرقابل تشخیص می کند و پایداری وقابل اطمینان بودن این آزمون برای اندازه گیری مرگ سلولی در اثر تابش را سوال برانگیز میکند.

محققین زیادی اثر تریگونلا رابر سیستمهای حیاتی بر رسی کرده اند. زرگر وهمکارانش شواهدی از اثر درمانی عصاره تریگونلا بر روی مدل های حیوانی با سروز کبدی بدون اثرات جانبی پیدا کردند(۱۰). تحقیق پاول وهمکارانش عملکرد خوب وبالقوه ازفعالیت ضد لوسمی شنبلیله را نشان داد و امید های خوبی از درمان لوسمی در آینده ایجاد کرد(۱۱،۱۲). تحقیق وان لی زیا (Wan-Li Xue) وهمکارانش نشان داد که عصاره تریگونلا می تواند قند خون و سطح چربیهای خون را کاهش دهد و ویزگیهای هموروژی را بهبود دهد(۱۳).

تحقیق گزارش شده توسط روزیور و و همکارانش اثر حفاظتی تحقیق شده آرد دانه تریگونلا بر کبد در رت های که با الکل مسمومیت داشتند نشانداد.اثر خوبی بخصوص در شمارش WBC خون وفعالیت آنزیمی و بخصوص با دوز های بالاتر (۱۰٪) بدست آمد(۱۵،۱۴). علیزاده و همکارانش رده سلولی KG-1 را با غلظت های مختلف عصاره تریگونلا با ودوره های مختلف درمان گردند وتعداد سلولها و زیست سلولی ورنگ آمیزی ومرگ سلولی را با میکروسکپ نوری بررسی کردند.. نتایج تحقیق آنان اثر ضد سرطانی وجلوگیری کننده از رشد سلول های سرطانی ونابودی انان توسط عصاره تریگونلا را نشان داد. القا مرگ برنامه ریزی شده(مرگ برنامه ریزی شده) ناچیز بود وجالب اینکه اثرآن بر سلولهای لنفوسیت معمولی از لحاظ شمارش وتغییر شکل سلولی بسیارناچیز بود. این تحقیق نشان داد که که استفاده از گیاهان دارویی می تواند درمان موثر وایمنی برای لوسمی باشد. این تحقیق در نوع خود برای اثرات شیمی درمانی تریگونلا بر ضد این رده سلولی جدید بود(۱۶).

نتیجه گیری:

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره تریگونلا بر روی لنفوسیتها هنگامی که مورد تابش قرار گیرند خاصیت تشدید مرگ سلولی را هنگامی که در محیط سلولی حاضر باشد بهمراه خواهد داشت و مسمومیت پرتوی بر روی لنفوسیت های T خون باحضور عصاره تریگونلا تشدید می شود. اگرچه این نتایج بخودی خود جالب توجه هستند اما برای کاربرد عملی این نتایج باید یافته های این تحقیق با استفاده از تحقیق مستقل دیگری تایید شود. . این تحقیقات ثانویه باید امکان حذف عوامل خطای ناخواسته مثل مرگ سلولی خالص در اثر عصاره تریگونلا را به تنهایی را فراهم کند. همچنین اثر دزتابش رادیواکتیو براین مرگ سلولی را با آزمایش ردیفی از دزهای تابش باید بررسی کند. بررسی اثر عصاره بر حساسیت رده سلولهای سرطانی و همچنین مقایسه با اثر آن با اثر عصاره برمرگ سلولی سلولهای ایمنی وآزمایش آن در محیط کشت ومدل های حیوانی آزمایشگاهی قطعا اثر بخش بودن این درمان به همراه اعمال پرتو X را روشن خواهد کرد. تایید این نتایج گام بلندی در درمان سرطان با اعمال پرتوهای X همچنین تهیه داروهای حفاظت پرتوی خواهد داشت.

References:

1) Menz R, Andres R, Larsson B, Ozsahin M, Trott K, Crompton N. Biological dosimetry: The potential use of radiation-induced apoptosis in human T-lymphocytes. Radiation and environmental biophysics. 1997;36(3):175-81.

2) airC.K.K ,Parida D.K. NomuraT. Radioprotectors in Radiotherapy ;J. Radiat.res.,(2001); 42, -21–37

3) 7-.Baraboi, V. A., Beloshiskii, P. V., Krasiuk, A. N. and Korkach, V. I. (1994) Oxygen dependent processes in the irradiated organisms.Fiziol.Zh. 40: 116–128.
Huang C-F, Lin S-S, Liao P-H, Young S-C , Yang C-C, The Immunopharmaceutical Effects 4) and Mechanisms of HerbMedicine, Cellular & Molecular Immunology, (2008);1;5
new class of 5) Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP: The vinca alkaloids: A oncolytic agents. Cancer Res 1963, 23:1390-1427.
Wani C, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail A: Plant antitumor agents 6) antitumor agent from and VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic Taxusbrevifolia. J Amer. Chem. Soc 1971,93:2325-2327.
Xue W-Li ,LiXS, Zhang J, Liu Y-H,WangZ-L,ZhangR-J.Effect of Trigonellafoenum- 7) graecum(fenugreek) extracton blood glucose, blood lipid and hemorheologicalproperties in streptozotocin-induced diabetic rats. Asia Pac. J. Clin.Nutr. 2007;16 (Suppl 1):422-426
International Atomic energy Agency.Cyto genetic dosimetry: Application in preparedness for 8) and response to radiation emergencies IAEA,Viena, September 2011;IAEA-EPR ;
aspect, CRC biomolecular and clinical 9) Benzie I.F.F.,Wachtel-Galor S; Herbal medicine: Press;Taylor& Francis Group. 2011/2 ed,368-9
Zargar S. Protective effect of Trigonellafoenum-graecumonthioacetamide induced 10) hepatotoxicity in rats, Saudi Journal of Biological Sciences (2014) 21, 139–145
Gopal P.K, Paul M,Paul S. Anti Leukemic Potential of Different Fenugreek 11) SeedGermplasms.Fenugreek Special Issue Mar/Apr 2014, American journal of social issues and humanities
Sreeja S., Anju V.S., Sreeja S., In vitro estrogenic activities of fenugreek 12) Trigonellafoenumgraecum seeds. Indian J Med Res 131, June 2010, pp 814-819
Xue W.L, Li X.S, Zhang J, Liu Y.H,Wang Z.L, Zhang R.J .Effect of Trigonellafoenum- 13) graecum (fenugreek) extracton blood glucose, blood lipid and hemorheologicalproperties in streptozotocin-induced diabetic rats. Asia Pac J ClinNutr 2007;16:422-426
Raju J, Patlolla J.M.R., Swamy M. V., RaoC.V.Diosgenin, a Steroid Saponin of 14) Trigonellafoenumgraecum(Fenugreek), Inhibits Azoxymethane-Induced AberrantCrypt Foci Formation in F344 Rats and InducesApoptosis in HT-29 Human Colon Cancer CellsCancerEpidemiol Biomarkers Prev 2004;13(8). August 2004
Rosioru C, Pribac G, Simeoni I, Craciun C, Ardelean A. Trigonellafoenumgraecum (Sicklefrui 15) Fenugreek) seeds – a natural hepato protector that prevents ethanol-induced toxicity Annals of RSCB Vol. XV, Issue 2
Alizadeh S, Jahanmehr S A-H, Ardjmand A R, Rezaian M, Dargahi H, Einolahi N, Sadrossadat 16) M. Antineoplastic Effect of Fenugreek (TrigonellaFoenumGraecum) Seed Extract against AcuteMyeloblastic Leukemia Cell Line (KG-1).Iranian journal of blood and cancer; 2009;(1) 4: 139-146