مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۷، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۴/ ۶۵-۵۷

مقاله پژوهشی

اثر کارواکرول بر مهار رشد و میزان تخریب ژنوم در سلول های سرطانی پروستات به روش الکتروفورز قلیایی

جواد صفاری چالشتری[۱]، مرتضی نیکوکار[۱*]، اسفندیار حیدریان[۱]، مهناز کلوشادی[۲]، پیام قاسمی دهکردی[۳]، مصطفی غلامی[۳]

[۱]مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱٤

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017

چکیده:

زمینه و هدف: **امروزه، سرطان ها یکی از بزرگترین نگرانی های جوامع بشری است. ترکیبات پلی فنلی و آنتی اکسیدان ها به عنوان یک فاکتور مهم و کلیدی در پیشگیری و یا درمان انواع سرطان ها به خوبی معرفی شده اند. این تحقیق با هدف بررسی اثر کارواکرول به عنوان یک ماده آنتی اکسیدانی قوی بر مهار رشد و میزان تخریب ژنوم رده سلول سرطانی PC3 پروستات انجام شده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، سلول های سرطانی PC3 پروستات با غلظت های مختلف کارواکرول تیمار و درصد زیست پذیری سلول ها به کمک روش رنگ سنجی تترازولیوم (MTT) اندازه گیری و سپس غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول‌ها (IC_{50}) محاسبه شد.در قدم بعدی، الکتروفورز قلیایی (comet assay) با توجه به IC_{50} برای سه غلظت ۱۳۰، ۲۳۰ و ۳٦۰ میکرومولار از کارواکرول انجام و ۱۰۰ عدد تصویر کامت های ایجاد شده با استفاده از نرم افزار CASP آنالیز گردید.**

یافته ها: **بر اساس مدل پروبیت میزان IC_{50} کارواکرول برای سلول های PC3، ۳٦۰ میکرومولار بدست آمد. در آزمون الکتروفورز قلیایی، نسبت طول کامت به قطر سلول در غلظت های ۱۳۰، ۲۳۰ و ۳٦۰ میکرومولار به ترتیب برابر ۲/۱±۱۵/۹، ٤/۲±۳۸/۷ و ۲/۰±٦۵/۳ درصد مشاهده شد ($P<0/05$).**

نتیجه گیری: **کارواکرول به عنوان یک ترکیب پلی فنلی موثر در درمان سرطان ها به طور بالقوه ای می تواند ژنوم سلول های PC3 مشتق از سرطان پروستات را تخریب کند. تخریب ژنوم سلول های PC3 در غلظت های نزدیک به IC_{50} بسیار محسوس تر است.**

واژه های کلیدی: **کارواکرول، سلول های PC3، سرطان پروستات، الکتروفورز قلیایی.**

مقدمه:

سرطان دومین علت مرگ و میر بعد از بیماری های قلبی- عروقی است (۱، ۲). در این بین سرطان پروستات (Prostatic cancer) شایع ترین نوع سرطان در میان مردان است (۳). سرطان پروستات در جوامع پیشرفته، دومین سرطان شایع بعد از سرطان پوست است هرچند در آفریقا به عنوان شایع ترین نوع سرطان شناخته شده است (۴). عوامل بسیار زیادی در بروز این نوع سرطان دخیل اند؛ اما همواره مطالعات گسترده ای نیز به منظور مهار و درمان این بیماری صورت گرفته است (۵). توقف رگ زایی و مهاجرت سلولی در تومور، تشدید و القای آپوپتوز و مرگ سلولی و همین طور مطالعه بر روی مسیرهای انتقال پیام در سلول از جمله روش های جدید و امیدوار کننده در درمان و کنترل سرطان می باشند (۶). امروزه استفاده از ترکیبات شیمیایی تخریب کننده ژنوم و القاء کننده آپوپتوز، جایگاه ویژه ای

*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی- تلفن: ۰۹۱۳۳۸۲۱٤٤۹، E-mail: j_saffari@yahoo.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017

در این مطالعات دارند (۷). عصاره های گیاهی و مخصوصاً مواد موثره موجود در آن ها حاوی ترکیبات پلی فنلی هستند که اثرات بالقوه ای بر مهار رشد سلول های سرطانی، تخریب ژنوم و القای آپوپتوز در این سلول ها دارند (۸). این مواد موثره طبیعی مانند آلکالوئیدها، ترپن ها، لیگنان ها و فلاونوئیدها در گیاهان مختلف دارای اثرات ضد توموری مختلفی می باشند (۹). مطالعات نشان داده است که چای سبز و زیره، غنی از ترکیبات پلی فنلی مانند کارواکرول می باشند که باعث احیای سلول های کبدی در موش هایی که مبتلا به Hepatectomy هستند می شوند. کارواکرول می تواند نقش حفاظت کنندگی بالقوه ای برای کبد داشته و همین طور منجر به افزایش قدرت احیا کنندگی سلول های کبد در موش شود (۱۰). گیاه آویشن (Zataria multiflora) نیز که در ایران و بسیاری از کشورها مصرف غذایی و دارویی زیادی دارد حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان زیادی از جمله کارواکرول می باشد و دارای اثر تحریکی در بیان ژن و پروتئین مهار کننده تومور retinoblastoma در کبد موش می باشد (۱۱، ۱۲). عصاره های گیاهی غنی از کارواکرول دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بسیار قدرتمند مانند ویتامین E و اسید آسکوربیک می باشند (۱۲، ۱۳). کارواکرول و بسیاری از آنتی اکسیدان های هم گروه آن دارای نقش بسزایی در جلوگیری از بروز بیماری هایی همچون سرطان می باشند. کارواکرول می تواند در القاء بسیاری از آنزیم های موثر در مهارکننده های متابولیسم سرطان ها و همین طور مهار بسیاری از عوامل و فاکتور های دخیل در بروز سرطان موثر باشد (۱۴). کارواکرول به عنوان یک ترکیب پلی فنلی قدرتمند با فعال کردن آپوپتوز دارای خاصیت ضد تکثیر روی سلول های سرطان ریه، chronic myeloid leukemia و سرطان سینه می باشد (۱۵). هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر کارواکرول به عنوان یک ماده آنتی اکسیدانی قوی بر مهار رشد و میزان تخریب ژنوم رده سلول سرطانی PC3 پروستات می باشد.

روش بررسی:

بررسی میزان زیست پذیری سلول ها: رده سلول های سرطان پروستات انسانی PC3 از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. این سلول ها در RPMI-1640 (Gibco, Canada) غنی شده با ۱۰٪ سرم (Fetal bovine serum= FBS، Gibco, Canada) و penicillin $۱۰^۲$ u/ml و (Gibco, Canada) L-glutamine Streptomycin ۰/۱ mg/ml و (Gibco, Canada) (Gibco, Canada) تحت شرایط کشت استاندارد (۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵٪ و co_2 ۵٪) قرار داده شدند (۱۶).

به منظور به دست آوردن میزان زیست پذیری سلول ها در برابر اثرات سمی کارواکرول، از آزمون MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyl-terazolium bromide] (BIO-IDEA) استفاده شد. بدین منظور، در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه ای، سلول های سرطانی PC3 را با تراکم ۵×۱۰^۳ در محیط RPMI حاوی ده درصد FBS منتقل کرده پس از آن به مدت یک شب انکوبه شدند. بعد از آن محیط کشت سلول ها را با محیط کشت حاوی غلظت های مختلف کارواکرول محلول در دی متیل سولفات (DMSO) ۰/۱٪ (در محدوده ۰-۱۰۰۰ میکرومولار) تعویض کرده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار دادیم. بعد از گذشت زمان مورد نظر، محیط کشت حاوی دارو از پلیت حذف و هر خانه با PBS شستشو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر RPMI و به دنبال آن ۱۰µL از محلول MTT با غلظت ۱۲mM به هر خانه از پلیت اضافه گردید و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط رویی حذف و ۵۰µL، DMSO به هر خانه اضافه گردید تا بلورهای فورمازان به صورت محلول درآیند؛ سپس با استفاده از دستگاه الایزا (stat Fax-2100, Spain) در طول موج ۵۷۰ نانومتر جذب نوری اندازه گیری شد. این آزمون برای هر غلظت از کارواکرول ۳ بار به صورت Triplicates انجام گرفت. درصد زیست پذیری سلول های تحت درمان در

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017

مقایسه با سلول های درمان نشده طبق فرمول زیر محاسبه و غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول‌ها (IC_{50}) محاسبه شد (۱۷، ۱۸).

"۱۰۰ × جذب نوری گروه کنترل/ جذب نوری گروه درمان شده"

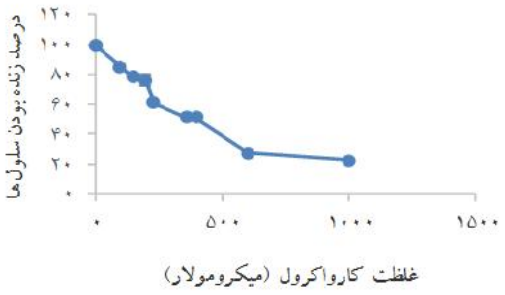
پس از مشخص شدن میزان زیست پذیری سلول های PC3 در برابر اثرات سمی کارواکرول و تعیین IC_{50}. سلول ها جمع آوری شده و برای مراحل بعدی و انجام آزمون الکتروفورز قلیایی مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش از دو غلظت پایین تر از IC_{50} برای انجام آزمون الکتروفورز قلیایی استفاده کردیم. از سلول های PC3 تیمار نشده به عنوان نمونه های کنترل منفی و سلول های PC3 تیمار شده با غلظت ۰/۱٪ DMSO به عنوان نمونه های شاهد استفاده کردیم. همینطور نمونه های کنترل مثبت شامل سلول های PC3 تیمار شده با غلظت ۵۰µM از H_2O_2 بودند (۱۹).

الکتروفورز قلیایی و سنجش کامت: ابتدا لام های تمیز و خشک را با متانول شسته و به آرامی حرارت دادیم. ۳۰۰ میکرولیتر آگاروز ۱٪ با نقطه ذوب معمولی (ژن فناوران) در فسفات بافر سالین (PBS) را بر روی لام ریخته و پس از لامل گذاری سریعاً بر روی یخ قرار دادیم تا سفت شود؛ سپس لامل را جدا کرده و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم تا کاملاً خشک شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از سلول های آماده شده را در ۸۰ میکرولیتر آگاروز ۱٪ با نقطه ذوب پایین (ژن فناوران) در بافر PBS به خوبی مخلوط کرده و ۱۰ میکرولیتر آنرا بر روی لایه اول لام ریخته و سریعاً لامل گذاری کردیم. پس از سرد شدن لامل را برداشته و لایه سوم را با آگاروز ۱٪ با نقطه ذوب معمولی (ژن فناوران) در بافر PBS بر روی لام قرار دادیم؛ سپس لام ها را برای مدت ۲۴ ساعت در ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر لیز کننده حاوی Na_2EDTA، ۰/۰۱ مولار (مرک آلمان) و Trizma base، ۰/۰۱ مولار (مرک آلمان) و NaCl، ۲/۵ مولار (مرک آلمان) به همراه یک میلی لیتر تریتون X100 ۱٪ (مرک آلمان) و محلول تازه ۱۰٪ DMSO (مرک آلمان) در جای تاریک و سرد قرار دادیم. پس از آن لام ها به آرامی به محلول بافر قلیایی شامل Na_2EDTA و NaCl با pH برابر ۱۳ برای ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و جریان برق با ۲۵ V و ۳۰۰ mA برای ۴۰ دقیقه در تانک الکتروفورز افقی (ATTO ژاپن) برقرار شد. پس از آن لام ها توسط محلول خنثی کننده حاوی محلول Trise HCl 0.4M (مرک آلمان) با pH برابر ۷/۵ برای سه مرتبه شسته شدند. پس از آن لام ها برای سه مرتبه با اتانول ۹۵ درجه تثبیت شده و در نهایت در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۲۰ µg/ml رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت و عدسی شیئی ۴۰X مشاهده شدند. برای هر غلظت ۱۰۰ تصویر سلولی توسط نرم افزار version1.2.2 CASP آنالیز شد. میزان IC_{50} کارواکرول برای سلول های PC3 با استفاده از مدل پروبیت در نرم افزار آماری SPSS محاسبه گرفت (۲۰).

یافته ها:

اثر کارواکرول بر رشد و تکثیر سلول های PC3: بررسی اثر کارواکرول در غلظت های ۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار بر روی سلول های PC3 در آزمون MTT نشان داد که با افزایش غلظت کارواکرول میزان زیست پذیری و تکثیر سلول های PC3 کاهش می یابد ($P<۰/۰۰۱$). بر اساس مدل پروبیت میزان IC_{50} کارواکرول برای سلول های PC3 برابر ۳۶۰ میکرومولار به دست آمد، به طوری که در غلظت های کمتر از IC_{50} یعنی ۱۳۰ و ۲۳۰ میکرومولار کارواکرول بیش از ۶۰ درصد از سلول های فوق زنده مانده اند (نمودار شماره ۱).

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017



نمودار شماره ۱: درصد زنده بودن (میزان بقاء) سلول ها در غلظت های مختلف کارواکرول

با افزایش غلظت کارواکرول میزان زیست پذیری سلول ها کم می شود.

در سلول های PC3 تیمار نشده با کارواکرول (کنترل منفی) نسبت طول کامت به قطر سلول تقریباً برابر ۱/۴±۱/۰ درصد مشاهده شد که عملاً در دسته سلول های بدون آسیب قرار می گیرند. این در حالی است که سلول های PC3 تیمار شده با محلول ۵۰µM H_2O_2 (کنترل مثبت) دارای طول کامت بسیار گسترده و نسبت طول کامت به قطر سلول برابر ۷۲/۱±۴/۱ درصد بودند. نسبت طول کامت به سلول در نمونه های شاهد و سلول های PC3 تیمار شده با غلظت ۰/۱٪ DMSO برابر ۱۲/۸±۲/۰ درصد بود (جدول شماره ۱).

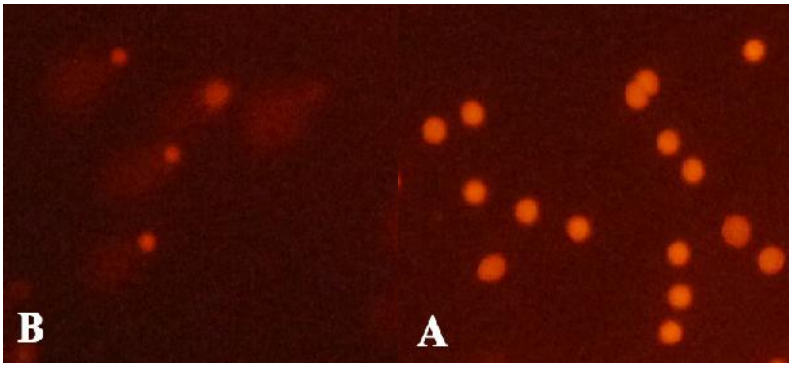
جدول شماره ۱: نتایج آزمون کامت (comet assay) سلول های PC3 در گروه های مختلف

گروه ها / پارامترها	بدون تیمار (کنترل منفی)	تیمار شده با DMSO ۰/۱٪ (شاهد)	تیمار شده با ۵۰µM H_2O_2 (کنترل مثبت)	تیمار شده با µM ۱۳۰ کارواکرول	تیمار شده با µM ۲۳۰ کارواکرول	تیمار شده با µM ۳۶۰ کارواکرول
ناحیه‌ی سر کامت	۵/۲±۹/۱	۶۱۹/۳±۲۲/۵	۱۷۰/۵±۸۷/٤	۵۵/۹±٤/٦	۸۳/٤±۲۰/۰	۵۱/۹±۲۲/۵
محدوده‌ی دنباله‌ی کامت	۳۵/۰±۲۳/٤	۲۸۸/۲±۳۷/٤	۱۱۹۳/۹±۳۷۷/٤	٤۲/٦±۸/٦	۱۵۱/٤±۳۲/۱	۱٤۹/۱±۳۷/٤
مقدار DNA در سر کامت	٤۳/٤±٦/۳	۹٤/۹±۰/٤	۹/٦±٤/۳	۸/٦±۰/۸	۹/۰±۲/۸	۲/۱±۰/٤
مقدار DNA در دنبالچه کامت	۰/۷±۰/۵	۱٤/۰±۰/۹	۲۵/۸±۱۲/۹	۱/٦±۰/۳	۵/۷±۱/۲	۳/۹±۰/۹
درصد طول سر کامت به دنبالچه کامت	۹۸/٦±۱/۰	۸۷/۲±۲/۰	۲۷/۹±٤/۱	۸٤/۱±۲/۱	٦۱/۳±٤/۲	۳٤/۷±۲/۰
*درصد طول دنبالچه کامت به سر کامت	۱/٤±۱/۰	۱۲/۸±۲/۰	۷۲/۱±٤/۱	۱۵/۹±۲/۱	۳۸/۷±٤/۲	٦۵/۳±۲/۰
شعاع سر کامت برحسب تعداد پیکسل	۱۳/۵±۱/۱	۱۳/٦±۰/۹	۲۸/۱±۷۳/۰	٤/۰±۰/۱	۵/۰±۰/۹	۳/۸±۰/۹
طول دنبالچه کامت از حاشیه ی سمت راست	٤/۰±۰/۵	۱۲/۱±۱/٤	۱٤۰/٤±۲۹۹/۹	۵/٤±۰/۸	۱۰/۸±۲/۱	۱٤/۳±۱/٤
طول کل کامت از حاشیه‌ی سمت چپ	۳۲/۱±۲/۲	٤۰/۳±۲/۵	۵۰/۰±۱٤/۷	۱٤/٤±۰/۹	۲۱/۹±۲/٤	۲۲/۹±۲/۵
درصد DNA در دم کامت ضربدر طول دم کامت	۰/۱±۰/۰	۱/٦±۰/۹	۳۳/۰±۱۲/٦	۰/۹±۰/۲	٤/۲±۱/۱	۹/۳±۰/۹

$P<۰/۰۵$ در نمونه کنترل مثبت نسبت به نمونه کنترل منفی و در غلظت های مختلف تیمار با کارواکرول؛ داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشد.

این نتایج در خصوص سلول های PC3 تیمار شده با غلظت های مورد مطالعه نشان داد، در غلظت ۱۳۰ µM کارواکرول، نسبت طول کامت به قطر سلول برابر ۱۵/۹±۲/۱ درصد و در غلظت ۲۳۰ µM کارواکرول، نسبت طول کامت به قطر سلول برابر ۳۸/۷±۴/۲ درصد و در غلظت ۳۶۰ µM کارواکرول، نسبت طول کامت به قطر سلول برابر ۶۵/۳±۲/۰ درصد مشاهده شد (جدول و تصویر شماره ۱).

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپی اثر کارواکرول در سلول های سرطانی پروستات (PC3) به روش الکتروفورز قلیایی (comet assay).

A) سلول های کنترل منفی و بدون دنباله کامت؛ B) سلول های تیمار شده با غلظت ۳۶۰ میکرومولار کارواکرول، سلول های تیمار شده با غلظت ۳۶۰ میکرولیتر کارواکرول دارای دنباله کامت بیشتری هستند.

بحث:

سرطان از جمله مهمترین عوامل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است و این امر موجبات نگرانی های شدیدی را در جوامع امروزی به دنبال داشته است (۲۱). همواره به موازات این نگرانی ها دانشمندان در پی آن بوده اند تا با استفاده از خواص بیولوژیک گیاهان دارویی و بکارگیری مواد موثره موجود آنان در صنعت داروسازی گامی بزرگ در جهت درمان این بیماری بردارند (۲۲). Bhattacharyya و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که چای سیاه باعث القای آپوپتوز در سلول های سرطان پستان می شود (۲۳). پس از آن Lu و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نیز تأیید کرند که ترکیبات پلی فنلی موجود در چای سیاه با مهار رشد سلول های سرطانی و فعال کردن مسیرهای آپوپتوز از رشد افسار گسیخته این دسته از سلول ها جلوگیری می کند (۲۴). در عین حال مطالعه دیگری توسط Athar و همکاران بر روی چای سبز انجام شد و نشان دادند که ترکیبات پلی فنلی این گیاه رشد سلول های (Epigallocatachin-3-gallate= EGCG) را در سرطان دهان به طور بالقوه از طریق فعال کردن مسیر آپوپتوز مهار می کند (۲۵). Zlotogorski و همکاران در سال ۲۰۱۳ با معرفی پلی فنل های موجود در چای سبز و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن ها توانستند رشد سلول های سرطانی و مخصوصاً سرطان سر و گردن را مهار کنند (۲۶). تحقیقات گسترده ای که بر روی ده اسانس گیاهی و مخصوصاً آویشن بر روی سلول های مشتق سرطان های پروستات، ریه و سینه انجام شد، نتایج بیانگر این مطلب بود که اسانس گیاه آویشن قدرت مهارکنندگی بسیار شدیدتری مخصوصاً بر میزان رشد سلول های سرطان پروستات در مقایسه با سایر گیاهان دارد (۲۷). Hotta و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مطالعات خود گزارش کردند که تیمول و کارواکرول از جمله مهمترین ترکیبات موجود در اسانس و عصاره گیاه آویشن اثرات بیولوژیک بالقوه ای را بر آنزیم های سلول اعمال می کنند (۲۸). این مطالعات و مطالعات مشابه بیانگر این نکته اند که این ترکیبات در کاهش میزان استرس اکسیداتیو و همینطور مهار آنزیم های سیکلواکسیژناز نقش کلیدی ایفا می کنند (۲۹، ۳۰). با استفاده از تکنیک های مختلف مطالعات بسیار گسترده ای بر روی ارتباط میزان اکسیداتیو و آسیب DNA انجام شده است (۳۱، ۳۲).

تکنیک کامت اسی یک تکنیک بسیار حساس، دقیق و در عین حال بسیار سریع است که بوسیله آن می توان میزان شکست های تک رشته ای و دو رشته ای

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017

را در مولکول DNA آسیب دیده در انواع سلول ها بررسی کرد (۲۰). Ghazalla و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از این تکنیک نشان دادند که غلظت ۵۰µM H_2O_2 در سلول های هپاتومای انسان می تواند شکست های تک رشته ای القاء کند این میزان آسیب DNA قابل بررسی و اندازه گیری است (۱۹).

در این مطالعه سلول های PC3 مشتق شده از سرطان پروستات با استفاده از داروی کارواکرول در غلظت های IC_{50} و دو غلظت پایین تر آن تیمار شدند. نتایج حاصل از الکتروفورز قلیایی بیانگر این نکته است که طول کامت ایجاد شده در سلول هایی که با غلظت های IC_{50} از داروی کارواکرول تیمار شده اند بسیار بزرگتر از قطر سلول بوده و این نشان دهنده اثرات مخربی است که بر سلول اعمال شده است. هر چند در غلظت های کمتر از IC_{50} طول کمتری از کامت مشاهده می شود؛ اما بر اساس تجزیه و تحلیل صورت گرفته با استفاده از نرم افزار CASP version1.2.2 اثرات تخریبی بر ژنوم این سلول ها کاملاً محسوس است. از آنجا که نسبت دم به سر کامت در سلول های PC3 تیمار شده با غلظت های نزدیک به IC_{50} یعنی غلظت ۱۳۰ µM کارواکرول برابر ۲/۱±۱۵/۹ می باشد آسیب جزئی را در بر داشته است. این شدت آسیب برای سلول های PC3 تیمار شده با ۲۳۰ µM کارواکرول برابر ۴/۲±۳۸/۷ که با آسیب شدید همراه بوده است؛ اما برای غلظت IC50 و ۳۶۰ µM آسیب بسیار شدید بوده و برابر ۲/۰±۶۵/۳ مشاهده شد (۳۳). این در حالی است که سلول های بدون تیمار با هیچ دارویی کاملاً بدون آسیب مشاهده شدند. از آنجا که لازمه تیمار کارواکرول بر روی سلول ها محلول بودن آن در غلظت ۰/۱٪ DMSO بود و خود این ترکیب برای سلول ها خواص سمی و آپوپتوزی دارد، نمونه شاهد یعنی سلول های PC3 تیمار شده با ۰/۱ درصد DMSO مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتیجه حاصل آسیب جزئی را برابر ۲/۰±۱۲/۸ برای این آزمایش در پی داشت (۳۳). بررسی انجام شده با استفاده از آزمون ANOVA نشان دهنده وجود سطح معنی داری ($P<0/05$) بین گروه های مختلف است هر چند اثر همپوشانی حاصل از استفاده همزمان دو ترکیب کارواکرول و DMSO در غلظت ۱۳۰ میکرومولار می تواند بر میزان تأثیر کارواکرول بر سلول ها موثر باشد. به این ترتیب می توان انتظار داشت که سلول های PC3 در غلظت های بالاتر از ۱۳۰ میکرومولار کارواکرول می توانند بر سلول های PC3 آسیب وارد کند.

نتیجه گیری:

این مطالعه نشان می دهد که کارواکرول به عنوان یک ترکیب پلی فنلی سودمند و یک آنتی اکسیدان قدرتمند توانسته است به نحوی آپوپتوز را در سلول های PC3 مشتق شده از سرطان پروستات القاء کند و با تخریب ژنوم این دسته از سلول ها مرگ برنامه ریزی شده را برای سلول به دنبال داشته باشد. شایان ذکر است این اثر القایی و آسیب سلولی در غلظت های نزدیک به IC_{50} بهترین تأثیر را به دنبال خواهد داشت. هر چند لازم است مطالعات بیشتری با استفاده از تکنیک Comet assay بر روی اثر این ماده موثره گیاهی بر سلول های سالم بررسی گردد و اثرات احتمالی آپوپتوزیس آن با نتایج حاصل از این مطالعه به خوبی تفسیر و تشریح گردد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره (۱۵۵۶) مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می باشد. بدینوسیله برخود لازم می دانیم که از حمایت های مالی آن معاونت محترم نهایت قدردانی به عمل آید؛ همچنین از کلیه پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد کمال تشکر را داریم.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017

منابع:

1. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level≤ 4.0 ng per milliliter. New Engl J Med. 2004; 350(22): 2239-46.
2. McConnell JD, Bruskewitz R, Walsh P, Andriole G, Lieber M, Holtgrewe HL, et al. The effect of finasteride on the risk of acute urinary retention and the need for surgical treatment among men with benign prostatic hyperplasia. Finasteride long-term efficacy and safety study group. N Engl J Med. 1998; 338(9): 557-63.
3. Roehrborn C, McConnell J. Etiology, pathophysiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. In: Walsh P, Retik A, Vaughan E, Wein A, editors. Campbell's Urology. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998: 1429-52.
4. Isaacs W, Xu J, Walsh P. Hereditary prostate cancer. In: Chung LWC, Issac WB, Simons JW, editors. Prostate cancer: biology, genetics and the new therapeutics. Totowa: Humana Press; 2001: 13-37.
5. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. Prostate. 1990; 17(4): 337-47.
6. Davies MA, Kim SJ, Parikh NU, Dong Z, Bucana CD, Gallick GE. Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. Clin Cancer Res. 2002; 8(6): 1904-14.
7. Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. AAPS J. 2006; 8(2): E239-53.
8. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol. 2005; 100(1-2): 72-9.
9. Uruena C, Cifuentes C, Castaneda D, Arango A, Kaur P, Asea A, et al. Petiveria alliacea extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. BMC Complement Altern Med. 2008; 8: 60.
10. Uyanoglu M, Canbek M, Aral E, Husnu Can Baser K. Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. Phytomedicine. 2008; 15(3): 226-9.
11. Vaziri GA. Essential oil of Zataria multiflora Boiss upregulates retinoblastoma tumor suppressor in the liver of rat. J Med Plant Res. 2010; 4: 1422-1427.
12. Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from Origanum syriacum L. growing in Turkey. Biol Pharm Bull. 2003; 26(12): 1725-9.
13. Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJ. Antioxidant and antimicrobial activity of Foeniculum vulgare and Crithmum maritimum essential oils. Planta Med. 2000; 66(8): 687-93.
14. Cassady JM, Baird WM, Chang CJ. Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. J Nat Prod. 1990; 53(1): 23-41.
15. Arunasree KM. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. Phytomedicine. 2010; 17(8-9): 581-8.
16. Kaur M, Velmurugan B, Rajamanickam S, Agarwal R, Agarwal C. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. Pharm Res. 2009; 26(9): 2133-40.
17. Kotake-Nara E, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita K, Nagao A. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. J Nutr. 2001; 131(12): 3303-6.
18. Kumi-Diaka J, Sanderson NA, Hall A. The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, DU145 and LNCaP. Biol Cell. 2000; 92(8-9): 595-604.
19. Benhusein GM, Mutch E, Aburawi S, Williams FM. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. Libyan J Med. 2010; 5.
20. Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. Methods. 2009; 48(1): 46-53.
21. Landis MD, Lehmann BD, Pietenpol JA, Chang JC. Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. Breast Cancer Res. 2013; 15(1): 201.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017

22. Kinghorn AD, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell G, Pezzuto J, Udeani G, et al. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. Pure Appl Chem. 1999; 71(9): 1611-8.
23. Bhattacharyya A, Lahiry L, Mandal D, Sa G, Das T. Black tea induces tumor cell apoptosis by Bax translocation, loss in mitochondrial transmembrane potential, cytochrome c release and caspase activation. Int J Cancer. 2005; 117(2): 308-15.
24. Lu J, Gosslau A, Liu AY, Chen KY. PCR differential display-based identification of regulator of G protein signaling 10 as the target gene in human colon cancer cells induced by black tea polyphenol theaflavin monogallate. Eur J Pharmacol. 2008; 601(1-3): 66-72.
25. Hsu S, Lewis J, Singh B, Schoenlein P, Osaki T, Athar M, et al. Green tea polyphenol targets the mitochondria in tumor cells inducing caspase 3-dependent apoptosis. Anticancer Res. 2003; 23(2B): 1533-9.
26. Zlotogorski A, Dayan A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer: II. Green tea extracts and resveratrol. Oral Oncol. 2013; 49(6): 502-6.
27. Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. Activities of ten essential oils towards Propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. Molecules. 2010; 15(5): 3200-10.
28. Hotta M, Nakata R, Katsukawa M, Hori K, Takahashi S, Inoue H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. J Lipid Res. 2010; 51(1): 132-9.
29. Mehraein-Ghomi F, Basu HS, Church DR, Hoffmann FM, Wilding G. Androgen receptor requires JunD as a coactivator to switch on an oxidative stress generation pathway in prostate cancer cells. Cancer Res. 2010; 70(11): 4560-8.
30. Undeger U, Basaran A, Degen GH, Basaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. Food Chem Toxicol. 2009; 47(8): 2037-43.
31. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988; 175(1): 184-91.
32. Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ. DNA damage and breast cancer risk. Carcinogenesis. 2003; 24(5): 883-9.
33. Kent CR, Eady JJ, Ross GM, Steel GG. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. Int J Radiat Biol. 1995; 67(6): 655-60.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2015 Aug, Sep; 17(3):57-65.

Original article

The effect of carvacrol on the growth inhibition and genomic destruction in prostatic cancer cells using comet assay technique

Saffari- Chaleshtori J[1], Nikoukar M[1*], Heidarian E[1], Keloushadi M[2], Ghasemi- Dehkordi P[3], Gholami M[3]

[1]Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran;[2]Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; [3]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 21/Jul/2014 Accepted: 6/Oct/2014

Background and aims: Nowadays, cancers are one of the biggest concerns of human societies. Polyphenolic compounds and antioxidants are a key factor in the prevention or treatment of various cancers. This study was aimed to investigate the effects of carvacrol as a strength antioxidant on growth inhibition and genomic destruction of prostatic cancer cells line PC3.

Methods: In this laboratory-experimental study, prostatic cancer cells line PC3 with different concentrations of carvacrol were selected and the percent of cells viability was measured using MTT assay on cells line PC3. Then, it was computed inhabitation concentration of 50 percent for the growth of IC50 cells. In the next step, alkaline electrophoresis (comet assay) regarding to the IC50 was done for 130, 230, and 360 µM concentrations of carvacrol and 100 comet pictures were analyzed with CASP software.

Results: According to probit model, the IC_{50} of carvacrol for PC3 cells was 360 µM. The rate of tail to head in comet assay at 130, 230, and 360 µM of carvacrol concentrations was 15.9±2.1, 38.7±4.2, and 65.3±2.0 percent, respectively ($P<0.05$).

Conclusion: Carvacrol as one compound of the effective polyphenoly in treatment of cancer can potentially destroy genomic cells line PC3 derived from in prostatic cancer. The genomic destruction of carvacrol on cells line PC3 is more effective in concentrations more near to the IC_{50}.

Keywords: Carvacrol, PC3 Cells, Prostate cancer, Comet assay.

Cite this article as: Saffari- Chaleshtori J, Nikoukar M, Heidarian E, Keloushadi M, Ghasemi- Dehkordi P, Gholami M. The effect of carvacrol on growth inhibition and genomic destruction in prostatic cancer cells using comet assay technique. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(3): 57-65.

[*]**Corresponding author:**
Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00989133821449, E-mail: j_saffari@yahoo.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:31 +0430 on Saturday August 26th 2017