تاثیر عصاره الکلی سیاهدانه بر میزان پرولیفریشن و آپوپتوزیس سلول های سرطانی کلیه رده ACHN

نفیسه السادات طبسی*، دکتر ابوالفضل خواجوی راد**[1]، دکتر محمود محمودی***، دکتر جواد بهارآرا†، دکتر مریم راستین††، دکتر مجتبی حسین پور مشهدی†††، اکرم شیخ♦، شهرزاد زمانی تقی زاده رابع♦، آزیتا آقایی♦♦، بی بی مرضیه احدی♦♦♦

*کارشناس ارشد فیزیولوژی –مرکز تحقیقات ایمونولوژی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، **استادیار گروه فیزیولوژی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ***استاد گروه ایمونولوژی- مرکز تحقیقات ایمونولوژی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، †استادیار گروه زیست شناسی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ††مرکز تحقیقات ایمنولوژی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، †††استادیار گروه علوم دامی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ♦کارشناس ارشد ایمونولوژی-مرکز تحقیقات ایمونولوژی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ♦♦کارشناس ارشد فیزیک پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ♦♦♦کارشناس زیست شناسی-دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۲۴ تاریخ تایید: ۸۹/۴/۷

چکیده:

زمینه و هدف: سیاه دانه (*Nigella sativa*) گیاهی ازتیره آلاله، علفی، یک ساله یا پایا است. ترکیبات این گیاه دارای خواص ضد سرطانی هستند. این مطالعه با هدف بررسی اثر سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره الکلی سیاهدانه بر روی رشد سلول های سرطانی کلیه انسان رده ACHN و سلول های غیر سرطانی سالم رده L929 انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی غلظت های مختلف عصاره الکلی سیاهدانه در محیط کشت، روی سلول های ACHN و L929 اثر داده شد. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده با میکروسکوپ معکوس ارزیابی گردید. با آزمون MTT اثر غلظت های عصاره بر درصد سلول های زنده هر دو رده سلولی در زمان‌های مذکور، از نظر کمی بررسی شد. بررسی میزان آپوپتوز با کیت فسفاتیدیل سرین با استفاده ار دستگاه فلوسیتومتری مشخص گردید. داده ها با استفاده از آنالیز آماری واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey آنالیز شد.

یافته ها: نتایج آزمون MTT نشان داد که غلظت های ۷۵۰ µg/ml و بالاتر عصاره بر سلول های رده ACHN و غلظت های ۱۲۵۰ µg/ml و بالاتر عصاره بر روی سلول های رده L929 موجب کاهش معنی دار تعداد سلول های زنده ACHN و L929 می گردد (P<۰/۰۵). نتایج بدست آمده از فلوسیتومتری نشان داد که حداکثر میزان آپوپتوز در رده سلولی ACHN در غلظت های ۱۰۰۰ µg/ml و ۱۲۵۰ بوده که این میزان برابر ۹۲٪ بود و حداکثر میزان آپوپتوز در سلول های رده L929 در غلظت ۱۵۰۰µg/ml دیده شد که این میزان برابر ۸۹٪ و هر دو در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این پژوهش عصاره الکلی سیاهدانه دارای اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک بر سلول های سرطانی رده ACHN در مقایسه با سلول های سالم L929 است. لذا می توان عصاره الکلی سیاهدانه را به عنوان ترکیبی با اثرات سایتوتوکسیک روی سلول های سرطانی در درمان سرطان کلیه پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی: آپوپتوتیک، سلول های ACHN، سلول های L929، سیتوتوکسیک، سیاهدانه، عصاره الکلی، فلوسیتومتری.

مقدمه:

شایع ترین نوع تومور کلیه آدنوکارسینوم سلول های کلیه است که ۸۵ درصد کل تومورهای کلیوی را به خود اختصاص می‌دهد. این تومورها به طور اولیه به ریه‌ها، استخوان، کبد، مغز و کلیه طرف مقابل متاستاز می‌دهند و یک سوم بیماران در زمان تشخیص دچار متاستاز شده‌اند درمان تومورهای کلیوی توسط جراحی

[1]نویسنده مسئول: مشهد –پردیس دانشگاه – بلوار وکیل آباد – گروه فیزیولوژی-تلفن: ۰۹۱۵۳۰۱۱۴۶۸، E-mail:khajavirada@mums.ac.ir

همراه شیمی درمانی، هورمون درمانی و اشعه درمانی انجام می شود.

از دیر باز تاثیر عصاره های مختلف گیاهی در درمان بیماری‌ها شناخته شده بود (۱). گیاه سیاهدانه (*Nigella Sativa*) گیاهی از تیره علفی آلاله و دارای گل هایی به رنگ سفید شیری می باشد. دانه های آن تیره و سه گوش و له شده آن بویی شبیه زیره دارد (۲). کاربردهای درمانی سیاهدانه از قرن ها پیش شناخته شده است (۳). از این گیاه به طور گسترده به خاطر اثرات آنتی بیوتیکی، اختلالات گوارشی و کبدی، درمان انگل های گوارشی، تحریک متابولیسم و درمان افسردگی استفاده می شده است (۵،۴). در پژوهش های متعدد مشخص شده که سیاهدانه و ترکیبات کینونی آن مثل تیموکینون (۷،۶) دارای اثرات ضد سرطانی در کولون، سینه، پوست، رحم و کبد می باشد (۹،۸). همچنین سیاهدانه دارای اثرات قلبی عروقی (۱۱،۱۰) و تحریک پاسخ ایمنی (۸) و اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی (۱۲) می باشد. مطالعات مختلف نشان داده که ترکیبات سیاهدانه می تواند میزان قند خون را در خرگوش ها کاهش دهد (۱۳). همچنین تیموکینون هم بر روی انباشت چربی در نفریت های حاصل از دوکسروبین تاثیر مثبت دارد (۱۴). اثرات ضد دردی و تسکینی که بر سیستم اعصاب مرکزی (CNS) در اثر مصرف اسانس سیاهدانه بوجود آمده به علت وجود ترکیبات اپیوئیدی در آن است (۱۰). خواص مفید سیاهدانه به علت وجود ترکیبات کینونی آن مثل تیموکینون و دی هیدروکینون می باشد. اثرات ضد سرطانی (۱۵) سیاهدانه به علت ایجاد القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی بوجود می‌آید (۱۶). تاکنون در مورد اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک عصاره الکلی سیاهدانه بر سلول‌های سرطانی کلیه گزارشی منتشر نشده است، لذا در این مطالعه اثر عصاره الکلی سیاهدانه بر رشد سلول های سرطانی کلیه انسان رده ACHN و نیز سلول های فیبروبلاست موشی رده L929 به عنوان سلول غیر سرطانی مورد بررسی و با یکدیگر مقایسه گردید.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی عصاره گیری با استفاده از روش شناخته شده سوکسله انجام شده برای این منظور ۱۰۰ گرم از پودر سیاهدانه با cc ۴۹۰ الکل ۹۶ درصد توسط دستگاه سوکسله عصاره گیری شد. عصاره از فیلتر سرنگی µm ۰/۲ عبور داده تا استریل شود. برای تعیین وزن خشک عصاره استریل، ۱۰ میلی لیتر از آن در پلیت با وزن معلوم ریخته و روی بن ماری ۷۰ درجه سانتی گراد الکل آن تبخیر شد و سپس با ترازوی دیژیتال سارتروس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین گردید.

بررسی مورفولوژیک: ابتدا هر دو رده سلولی از تانک ازت خارج و مرحله یخ زدایی سلول ها انجام شد. پس از انجام یک دوره پاساژ سلولی و تعیین Viability سلول ها با استفاده از تست تریپان بلو، ۳ فلاسک کشت ۲۵ میلی لیتری برای سلول های ACHN و سه فلاسک کشت مشابه نیز برای سلول های L929 در نظر گرفته شد. محیط کشت فلاسک ها از نوع DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم FBS و ۱ درصد پنی سیلین – استرپتومایسین بود (۱۷). فلاسک ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت که سلول‌ها به کف فلاسک کشت چسبیدند مرحله اثر دادن عصاره بر سلول ها به این ترتیب انجام شد: از پلیت ۹۶ خانه برای انجام آزمایش استفاده شد. برای سلول های ACHN سه پلیت و برای هر غلظت، سه خانه در نظر گرفته شد برای سلول های L929 نیز به همین صورت عمل شد. در هر خانه ۵۰۰۰ سلول به همراه ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه کرده (۱۶) و ۲۴ ساعت بعد زمانی که سلول ها به کف خانه ها چسبیدند محیط کشت هر خانه خالی گردید. با استفاده از محیط کشت استریل از عصاره غلظت های µg/ml ۰، ۵۰، ۲۵۰، ۷۵۰، ۱۲۵۰ و ۱۷۵۰ تهیه شد و با توجه به اینکه تست به صورت سه تایی انجام شد به هر سه خانه µl ۲۰۰ از هر غلظت اضافه گردید. برای سلول های L929 نیز به همین ترتیب عمل کردیم. سپس همه پلیت ها

در انکوباتور قرار داده شد و پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس بررسی و مشاهدات ثبت گردید. این گونه ارزیابی مورفولوژیک سلولی، برای هر غلظت از عصاره ۳ بار تکرار شد تا اطمینان کافی از نتایج بدست آمده حاصل گردد.

آزمون MTT: از هر رده سلولی ACHN و L929، پس از انجام پاساژ و تعیین Viability یک سوسپانسیون سلولی در محیط کشت با همان ویژگی‌های قبلی تهیه شد که در هر میلی لیتر آن $۲/۵ \times ۱۰^{۴}$ سلول وجود داشت. برای این آزمون ۳ پلیت ۹۶ خانه ای برای هر رده سلولی در نظر گرفته شد در هر خانه ۰/۲ µl از سوسپانسیون سلولی مزبور در نظر گرفته شد. بنابراین هر خانه حاوی ۵۰۰۰ سلول بود. پلیت ها ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول ها به بستر خود بچسبند پس از طی این مدت مرحله مجاور کردن سلول ها با عصاره به این ترتیب انجام شد: با استفاده از محیط کشت استریل از عصاره غلظت های µg/ml ۱۰،۰، ۵۰ ، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰ و ۲۰۰۰ تهیه شد و با توجه به اینکه تست به صورت سه تایی انجام می‌شود به هر سه خانه ۲۰۰ µl از هر غلظت اضافه می‌شود. برای سلول‌های L929 نیز به همین ترتیب عمل شد. محیط کشت این پلیت ها را پس از ۲۴ ساعت خالی کرده و ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه همراه با ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT (4,5-dimethyl diphenyl tetrazoliom bromide) اضافه و ۴ ساعت در انکوباتور گذاشته شد. پس از آن محیط کشت حاوی رنگ MTT خالی و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) جایگزین آن شد و جذب نوری هر خانه توسط دستگاه Eliza reader و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری گردید (۱۸).

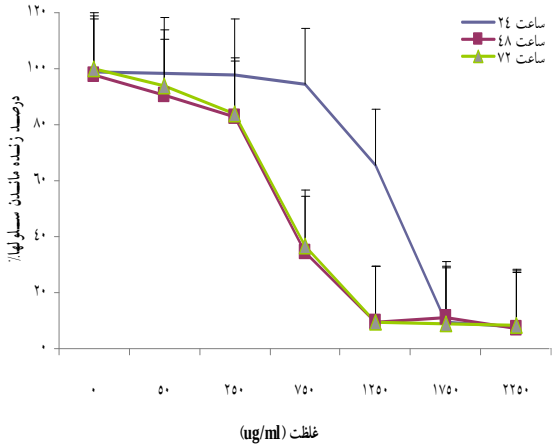
فلوسیتومتری: طبق دستور کیت (Phosphatidyl serine Detection-IQP-116F) ساخت کشور هلند از پلیت های ۲۴ خانه و تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول استفاده شد و به همان روشی که در تست MTT بیان شد سلول ها را در پلیت کشت دادیم، سپس سلول ها را پس از ۴۸ ساعت (۱۶) با Tripsin –EDTA از کف خانه ها جدا کرده و ۲ بار با بافر کلسیم شستشو داده، سپس ۱۰ میکرولیتر از Annexin V را با ۱۰۰ میکرولیتر سلول مخلوط کرده، ۲۰ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شد، سپس سلول ها را شسته و ۱۰ میکرولیتر رنگ پروپیدیوم ایوداید (PI) به آن اضافه و ۱۰ دقیقه در تاریکی روی یخ انکوبه کردیم و نمونه ها با فلوسیتومتری مدل (Becton Dickinson. Facs caliber-USA) آنالیز شدند. در این روش سلول هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند فقط رنگ Annexin V را گرفتند و سلول هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شدند و دیواره سلولی آنها اندکی نفوذ پذیر شده با دو رنگ Annexin V و رنگ PI رنگ شده و سلول هایی که دچار نکروز شده فقط رنگ PI را به خود گرفتند و هر کدام در Plot فلوسیتومتری جداگانه قرار گرفته و به این ترتیب دسته های مختلف سلولی جدا شدند. (در این تست دامنه غلظت ها وسیع تر در نظر گرفته شد).

داده ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $P<۰/۰۵$ معنی دار تلقی گردید.

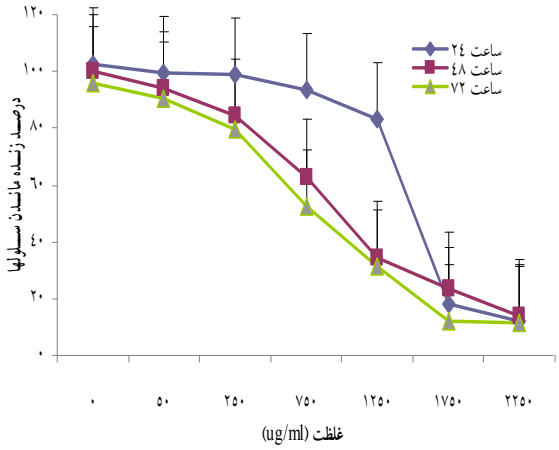
یافته ها:

نتایج بررسی مورفولوژی: بر اساس مشاهده سلول های ACHN با میکروسکوپ، پس از ۲۴ ساعت عصاره الکلی سیاهدانه با غلظت های µg/ml ۷۵۰ و بالاتر در مقایسه با سلول های گروه کنترل ACHN باعث شد که سلول ها از کف بستر خود کنده شده و از حالت دوکی شکل به صورت گرد درآیند.

ارزیابی مورفولوژی سلول های L929 یعنی سلول های غیر سرطانی نشان داد که پس از ۲۴ ساعت اثر عصاره الکلی سیاهدانه با غلظت µg/ml ۱۲۵۰ و بالاتر سبب غیر طبیعی شدن مورفولوژی سلول ها در مقایسه با سلول های گروه کنترل L929 گردید. در غلظت µg/ml ۷۵۰ از عصاره الکلی سیاهدانه سلول های رده L929 تغییر چندانی نشان ندادند. ضمناً مقایسه سلول های رده ACHN با رده



نمودار شماره ۱: تاثیر عصاره الکلی سیاه دانه در زمـان های ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های رده ACHN



نمودار شماره ۲: تاثیر عصاره الکلی سیاه دانه در زمان‌های ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت بر رده سلول‌های L929

L929 در هر غلظت نیز بیانگر تاثیر شدیدتر عصاره سیاهدانه بر سلول های سرطانی رده ACHN بود.

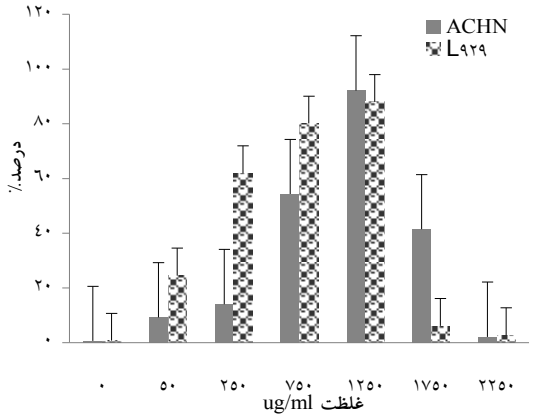
نتایج آزمون MTT: جذب نوری ثبت شده از خانه های حاوی سلول‌هایی که در مجاورت عصاره بودند، با جذب نوری خانه هایی که تحت تاثیر عصاره نبودند (خانه های کنترل) مقایسه گردید و درصد سلول های زنده با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{جذب نوری سلولهای تحت تاثیر عصاره در هر خانه}}{\text{میانگین جذب نوری خانه های حاوی سلولهای کنترل}} \times ۱۰۰ = \text{درصد سلول های زنده نسبت به سلولهای کنترل}$$

کاهش درصد سلول های زنده در رده ACHN نسبت به گروه کنترل سلول های ACHN در زمان ۲۴ ساعت در غلظت (µg/ml)۷۵۰ و بالاترعصاره الکلی سیاهدانه مشاهده شد که این کاهش معنی دار بود (P<۰/۰۵). پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، کاهش درصد سلول های زنده نسبت به گروه کنترل سلول های ACHN در غلظت (µg/ml)۷۵۰ و بالاتر عصاره الکلی سیاهدانه مشاهده شد که این کاهش معنی دار بود (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۱).

پس از گذشت ۲۴ ساعت از تاثیر عصاره الکلی سیاهدانه، کاهش معنی دار درصد سلول های زنده رده L929 نسبت به گروه کنترل از غلظت (µg/ml) ۱۲۵۰ به بالاتر مشاهده شد که این اختلاف نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (P<۰/۰۵). پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، کاهش معنی دار درصد سلول های زنده L929 نسبت به گروه کنترل از غلظت (µg/ml) ۷۵۰ به بالاتر عصاره مشاهده شد (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲).تاثیر افزایش غلظت عصاره الکلی سیاهدانه و همچنین افزایش زمان در هر دو رده سلولی ACHN و L929 بر کاهش درصد زنده ماندن سلول ها در غلظت (µg/ml)۷۵۰ و بالاتر عصاره در رده سلولی ACHN و در غلظت (µg/ml)۱۲۵۰ و بالاتر عصاره در رده L929 نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) آنها مشخص است (P<۰/۰۵). همچنین مقایسه اثر عصاره الکلی سیاهدانه بر روی هـــر دو رده سلولی نشان داد، در زمان های مشابه تیمـــار با عصاره الکلی سیاهدانه در غلظت‌های (µg/ml)۷۵۰ و بالاتر عصاره رده سلولی ACHN نسبت به رده سلولی L929 در همین غلظت ها دارای کاهش بیشتری در درصد زنده ماندن سلول ها بود (P<۰/۰۵).

نتایج فلوسیتومتری: میزان آپوپتوز اولیه در زمان ۴۸ ساعت در سلول های ACHN در غلظت (µg/ml)۱۰ و بالاتر از عصاره الکلی سیاهدانه نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) ACHN و نسبت به رده سلولی L929 افزایش معنی داری داشت (P<۰/۰۰۱). حداکثر درصد آپوپتوز اولیه در سلول های ACHN در غلظت (µg/ml) ۱۲۵۰ که برابر ۹۲/۹۶ درصد بود. در سلول های L929 حداکثر درصد آپوپتـــوز اولیـــه در

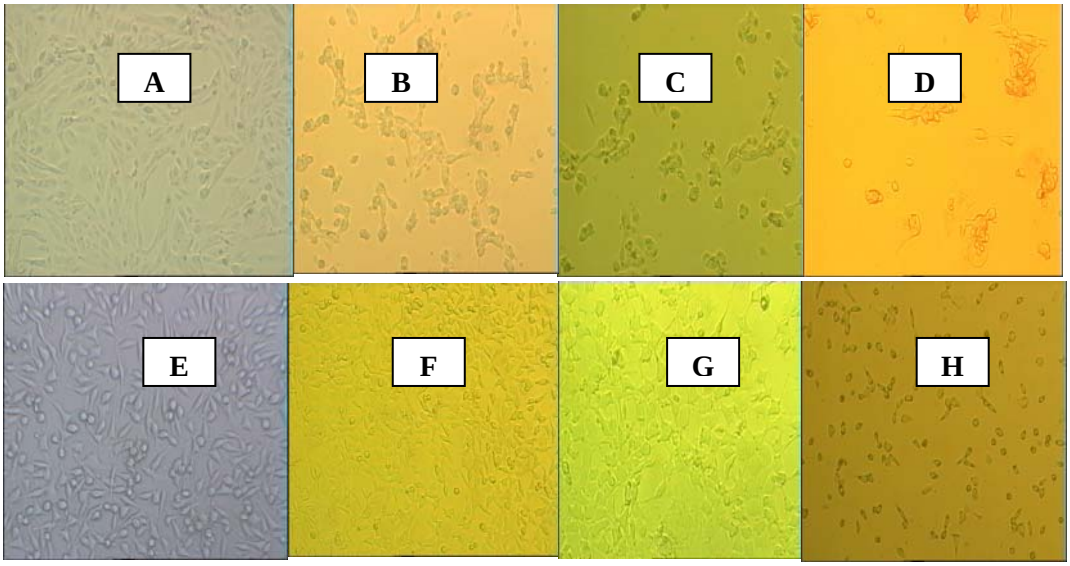


نمودار شماره ۳: تاثیرعصاره الکلی سیاهدانه بر اپوپتوز اولیه سلول های ACHN، L929

غلظت های (µg/ml) ۱۵۰۰ که برابر ۸۹/۹۰ درصد بود. میزان آپوپتوز اولیـه در سلول های از غلظت (µg/ml) ۵۰ نسبت به گروه کنترل L929 معنی دار بود (P<۰/۰۰۱) (نمودار شماره ۳).

اثر آپوپتوتیک عصاره الکلی سیاهدانه بر سلول های سرطانی رده ACHN بیشتر و با سلول های سالم رده L929 قابل مقایسه است و ثانیاً افزایش غلظت عصاره بالاتر از مقداری که حداکثر درصد آپوپتوز اولیه را ایجاد می کند سلول های هر دو رده را به نحو تقریباً مشابهی به سمت نکروز سلولی پیش می برد (تصویر شماره ۱).

ضمناً در روش فلوسیتومتری درصد آپوپتوز اولیه سلول های رده ACHN در غلظت µg/ml ۱۰ و سلول های رده L929 در غلظت µg/ml ۵۰ از عصاره الکلی سیاهدانه نسبت به سلول های کنترل همان رده افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) که می‌تواند بیانگر دقت بیشتر روش فلوسیتومتری نسبت به روش‌های بررسی مورفولوژیک و آزمون MTT در مطالعات مشابه بوده و از طرفی ترجیح اثر عصاره الکلی سیاهـدانه بر روند آپوپتوز نسبت به نکروز سلولی را پیشنهاد نماید. همچنین با کمک این روش و استفاده از کیت فسفاتیدیل سرین و پروپیدیوم آیوداید توانایی جداسازی سلول های حاصل از آپوپتوز اولیه و نکروز وجود داشت در حالی که در تست MTT و روش مورفولوژی این امکان وجود نداشت.



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپی مقایسه سلول های ACHN و L929 پس از ۲۴ ساعت در مجاورت با عصاره غلظت های µg/ml ۰، ۷۵۰، ۱۲۵۰ و ۲۲۵۰ عصاره الکلی سیاهدانه.

A- *سلول های* ACHN *در غلظت* µg/ml ۰ *عصاره الکلی سیاهدانه*
B- *سلول های* ACHN *در غلظت* µg/ml ۷۵۰ *عصاره الکلی سیاهدانه*
C- *سلول های* ACHN *در غلظت* µg/ml ۱۲۵۰ *عصاره الکلی سیاهدانه*
D- *سلول های* ACHN *در غلظت* mg/ml ۲۲۵۰ *عصاره الکلی سیاهدانه*
E- *سلول های* L929 *در غلظت غلظت* µg/ml ۰ *عصاره الکلی سیاهدانه*
F- *سلول های* L929 *در غلظت* µg/ml ۷۵۰ *عصاره الکلی سیاهدانه*
G- *سلول های* L929 *در غلظت* µg/ml ۱۲۵۰ *عصاره الکلی سیاهدانه*
F- *سلول های* L929 *در غلظت* µg/ml ۲۲۵۰ *عصاره الکلی سیاهدانه*

بحث:

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره الکلی سیاهدانه بر رده ACHN دارای اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک است ضمن اینکه شروع اثر و شدت اثر بین سلول های این رده و رده سالم L929 متفاوت است.

ضمناً این نتایج پیشنهاد می کند که تاثیرات مناسب درمانی عصاره در محدوده غلظت و چهارچوب زمانی مشخصی بوده که نیاز به بررسی بیشتری در این زمینه وجود دارد. مقایسه نتایج حاصل از تست MTT و روش فلوسیتومتری نشان داد که غلظت هایی از عصاره که با درصد بالایی از آپوپتوز در فلوسیتومتری همراه بودند باعث کاهش معنی داری در میزان زنده ماندن سلول ها در نتایج حاصل از تست MTT نیز می شوند.

با توجه به اینکه سلول‌های سرطانی انسانی ACHN از نوع اپی تلیال می‌باشد و سلول های رده L929 سلول های فیبروبلاست موشی است، این احتمال نیز وجود دارد که مقایسه سلول های ACHN با یک رده اپی تلیال سالم ما را به قضاوت بهتری در مورد نحوه اثر و غلظت موثر عصاره الکلی سیاهدانه بر سلول های سرطانی رده ACHN برساند.

اثرات مهاری عصاره الکلی سیاهدانه و ترکیبات موثره آن مثل تیموکینون بر روی چندین رده از سلول های سرطانی در بافت های مختلف انسان و حیوان مانند سلول های کبدی (۱۹)، سلول های کولونی (۲۰)، سلول های سرطان سینه (۲۱)، سلول های فیبرین سارکوما (۲۲) دارای خاصیت ضد تکثیر سلول های سرطانی یا به عبارتی ضد سرطانی می باشد. همچنین در مورد سلول های معده (۲۳)، سلول های خونی و سلول های قلبی (۲۴) نیز دارای اثرات آپوپتوتیک و کاهنده اثرات سمی دارویی در درمان های متداول سرطان‌ها می‌باشد. برای توجیه اثرات ضد سرطانی عصاره الکلی سیاهدانه و ترکیبات کینونی موجود در آن، مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد شده است که بخشی از آن مربوط به تاثیر بر فعالیت آنزیم‌ها، دفع رادیکال های آزاد، مهار پرولیفراسیون سلولی، تغییر میزان گلوتاتیون داخل سلولی، فعالیت آنتی اکسیدانی (۲۵) و شکار رادیکال های آزاد (۲۶) و نیز القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی از طریق مسیرهای وابسته به P53 و مسیر غیر وابسته به P53 می باشند (۲۹-۲۴).

به نظر می رسد که در میان این مکانیسم‌ها، القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از مهمترین مکانیسم‌های موثر در فعالیت ضد سرطانی عصاره الکلی سیاهدانه می باشد (۲۴،۱۸) که یافته های این بررسی نیز آن را تایید می‌کند.

همچنین مطالعات قبلی اثرات تیموکینون بر روی سلول‌های سرطانی کولون، شامل: مهار رشد سلول‌های سرطانی کولون، تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها و نیز افزایش درصد آپوپتوز را نشان داد (۱۶). که این بررسی ها تایید کننده نتایج حاصل از مطالعه اخیر مربوط به اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره الکلی سیاهدانه بر سلول های سرطانی کلیه رده (ACHN) می باشد.

نتیجه گیری:

این تحقیق برای اولین بار توانست نقش آپوپتوتیک و ضد تکثیر سلولی عصاره الکلی سیاهدانه را با تاثیر بر روی سلول های سرطانی کلیه رده ACHN در مقابل سلول های غیر سرطانی L929 نشان دهد که این تاثیر با مکانیسم آپوپتوزیس فعال و پیش می‌رود. تحقیقات بیشتر جهت شناختن مکانیسم سلولی و ملکولی عملکرد عصاره الکلی سیاهدانه بر مسیر آپوپتوزیس لازم می باشد.

تشکر و قدردانی:

بخشی از هزینه این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تامین گردید که به این وسیله تشکر و قدردانی می شود. همچنین از خانم ها بروک و قاسمی به خاطر همکاری های صمیمانه در انجام این پژوهش تشکر می گردد.

منابع:

1. Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa L*. seeds. J Ethnopharmacol. 2000 Apr; 70(1): 1-7.

2. Rojhan MS. Healing with medicine plants. Tehran: Alavi Pub; 2003. p: 157-9.

3. Zargari-Ali. Medicine plants. Tehran: University of Tehran Press; 1992. p: 43-5.

4. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa L*. seeds. Int Immunopharmacol. 2005 Dec; 5(13-14):1749-70.

5. Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. Int J Immunopharmacol. 1999 Apr; 21(4): 283-95.

6. Nergiz C, Otels S. Chemical composition of *Nigella sativa* seeds. Food Chem. 1993; 48: 259-61.

7. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa L*.). J Pharm Biomed Anal. 1999 Apr; 19(5): 757-62.

8. Salomi NJ, Nair SC, Javawardhanan KK, Varghese CD, Panikkar KR. Antitumour principles from *Nigella sativa* seeds. Cancer Lett. 1992 Mar; 63(1): 41-6.

9. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The invitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa L*. Anticancer Res. 1998 May-Jun; 18(3A): 1527-32.

10. Agarwal R, Kharya MD, Shrivastava R. Pharmacological studies of essential oil and unsaponifiable matter of seeds of *Nigella sativa.* Indian J Pharmacological Sci. 1979; 41: 248-510.

11. Aqel M. The relaxant effect of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on vascular smooth muscle. Jordan Ser B. 1995; 19: 91-100.

12. Al-Ghamdi MS.The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. J Ethnopharmacol. 2001 Jun; 76(1): 45-8.

13. Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. J Vet Med Physiol Pathol Clin Med. 2001 Dec; 48(10): 593-9.

14. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. Toxicology. 2000 Mar; 14(3): 219-26.

15. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa L*.) extracts. Braz J Med Biol Res. 2007 Jun; 40(6): 839-47.

16. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, et al. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. Int J Oncol. 2004 Oct, 25(4): 857-66.

17. Freshnry RI. Culture of animal cell: manual of basic technique. 4th ed. NewYork: Wily-Liss Pub. 2000. p: 550-70.

18. Shoeib AM, Elgayyar M, Dudrich P, Bell J. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. Int J Oncol. 2003; 22: 107-13.

19. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. Toxicology Lett. 1998 Mar; 95(1): 23-9.

20. Salim EI, Fukushima S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa L*.) seeds against rat colon carcinogenesis. Nutr Cancer. 2003; 45(2): 195-202.

21.Farah IO, Begum RA. Effect of *Nigella sativa L.* and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells. Biomed Sci Instrum. 2003; 39: 359-64.

22. Award EM. In vitro decreases of the fibrinolytic potential of cultured human fibrin sarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil. Phytomedicine. 2005 Jan; 12(2): 100-7.

23.El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM. Effects of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. J Ethnopharmacol. 2000 Sep; 72(1-2): 299-304.

24. Muhtasib H, Roessner A, Schneider R. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug form natural sources. Int J Bioche & Cell Biol. 2006 Nov; 38(8): 1249-53.

25. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent super oxide anion scavenger. Drug Chem Toxical. 2003 May; 26(2): 87-98.

26. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa*. Pharm Bull. 2000; 24: 307-10.

27. Musa D, Dilsiz N, Gumushan H, Bitiren M. Antitumor activity of an ethanol extracts of *Nigella sativa* seeds. Biologia (Bratisl). 2004; 59(6): 735-40.

28. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activationof caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblasticleukemia HL-60 cells. Int J Cancer. 2005; 117: 409-17.

29. Abul-Nasr SM, EI-Shafey MD, Osfor MM. Amelioration by *Nigella sativa L.* of methotrexate-indused toxicity in mail albino rate: a biochemical hematological and histological study. Scintia Agricul Bohem. 2001; 32: 123-60.