مجله دانشکده
دندانپزشکی اصفهان
۱۳۹۶؛ ۱۳(۱): ۱ تا ۱۱

بررسی اثر مهارکنندگی رشد و سمیت سلولی عصاره‌ی بنفشه بر روی رده‌ی سلولی اسکواموس سل کارسینوما در محیط آزمایشگاهی

حیدر خادمی [۱]
زهرا گلستان‌نژاد [۲]
مهدی صادقی [۳]

۱: دانشیار، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲: **نویسنده مسؤول:** استادیار، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
Email: dr_zgolestan@yahoo.com
۳: دانشجوی دندان‌پزشکی، کمیته پژوهش‌های دانشجویی، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

مقدمه: بدخیمی علت اصلی مرگ در کشورهای توسعه یافته و دومین علت مرگ در کشورهای در حال توسعه است. سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن ششمین سرطان شایع جهان بوده و درمان‌های استاندارد آن در چهار دهه‌ی اخیر نتوانسته درصد بقای این بیماران را بهبود بخشد. همچنین این درمان‌ها باعث بروز عوارض جوانبی متعددی می‌گردد. اخیرا مطالعه بر مواد طبیعی با خاصیت ضد بدخیمی هدفمند علیه سلول‌های بدخیم و پتانسیل عوارض جانبی کمتر صورت گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهار رشد و سمیت سلولی عصاره‌ی بنفشه با پتانسیل اثر انتخابی بر سلول‌های بدخیم در مقایسه با نرمال بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی آزمایشگاهی، جهت بررسی سمیت سلولی عصاره‌ی گیاه بنفشه از روش نورسنجی با استفاده از MTT (Microculture Tetrazolium Test) استفاده گردید. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه الایزاریدر اندازه‌گیری و درصد بقای سلولی با فرمول تفاوت جذب نوری بلانک از سلول‌های تیمار شده تقسیم بر تفاوت جذب نوری بلانک ازکنترل منفی محاسبه گردید. نتایج وارد نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۲ گردید و برای بررسی همزمان اثر غلظت عصاره و نوع سلول بر درصد سلول‌های زنده‌ی باقی‌مانده آنالیز واریانس دوطرفه و برای بررسی اثر غلظت عصاره بر درصد سلول‌های زنده‌ی باقی‌مانده به تفکیک هر رده سلولی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و دوطرفه استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد درصد سلول‌های زنده‌ی باقی‌مانده با غلظت‌های مختلف عصاره ارتباط معنی‌دار دارد (p value<۰/۰۰۱) در حالی که با نوع سلول ارتباط معنی‌دار ندارد (p value = ۰/۲۶).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد خاصیت کشندگی سلولی عصاره‌ی بنفشه بر رده‌ی سلولی تومورال سرطان سلول سنگفرشی با رده‌ی نرمال مشابه است. بر اساس این مطالعه عصاره‌ی بنفشه نمی‌تواند به عنوان ماده طبیعی با خاصیت ضدبدخیمی هدفمند و خاصیت عوارض جانبی کمتر علیه این سرطان به کار رود.

کلید واژه‌ها: سرطان سلول سنگفرشی، سمیت، بنفشه.

تاریخ ارسال: ۹۵/۶/۲۵ **تاریخ اصلاح:** ۹۵/۸/۲۷ **تاریخ پذیرش:** ۹۵/۹/۲

استناد به مقاله: خادمی ح، گلستان‌نژاد ز، صادقی م. بررسی اثر مهارکنندگی رشد و سمیت سلولی عصاره‌ی بنفشه بر روی رده‌ی سلولی اسکواموس سل کارسینوما در محیط آزمایشگاهی. مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان. ۱۳۹۶؛ ۱۳(۱): ۱-۱۱.

مقدمه

بدخیمی علت اصلی مرگ در کشورهای توسعه یافته و دومین علت مرگ در کشورهای در حال توسعه است. اسکوآموس سل کارسینومای سر و گردن HN SCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) ششمین سرطان شایع در جهان بوده (۱) و در هر سال تقریبا ۶۰۰ هزار مورد جدید از آن گزارش می‌شود (۲).

اتیوپاتولوژی اسکوآموس سل کارسینومای سر و گردن چندعاملی و شامل عوامل محیطی و عوامل مستعدکننده ژنتیکی است (۳) در مطالعه‌ی لاکو و همکاران (۱) پلئومورفیسم پروتئین‌های ترمیم‌کننده DNA (Deoxyribonucleic Acid) در کارسینومای سر و گردن مشاهده شده است.

افزایش وقوع اسکوآموس سل کارسینومای سر و گردن از سال ۱۹۱۵ نشان می‌دهد که عوامل کارسینوژن محیطی بیشترین نقش را در ایجاد سرطان‌های دهانی دارند (۳). مهمترین عوامل محیطی کارسینوژن دهانی شامل: مصرف تنباکو (۴)، مصرف الکل، رژیم غذایی، نمای توده بدنی BMI (Body Mass Index) (۵)، بهداشت دهانی و عفونت‌های ویروسی است (۳).

در سال‌های اخیر، تغییرات تدریجی در مشخصات دموگرافیک کارسینومای سر و گردن به صورت کاهش بروز اسکوآموس سل کارسینومای دهان و افزایش بروز اسکوآموس سل کارسینومای ناحیه اوروفارنکس و قسمت‌های خاصی از خلف دهان رخ داده است. رژیم‌های استاندارد درمان کارسینومای دهانی شامل جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی است (۶).

عوارض جانبی رژیم‌های درمانی معمول شامل نوروپاتی محیطی (۷)، فیبریلاسیون بطنی (۸)، سمیت سیستم گوارشی (۹) و ایجاد علایم گوارشی شامل اسهال، تهوع، استفراغ و یبوست، اختلال عملکرد عصبی (۱۰)، ریزش مو (۱۱)، التهاب مخاط (۱۲) و عوارض چشمی (۱۳) می‌باشد.

درمان‌های استاندارد اسکوآموس سل کارسینومای دهانی در چهار دهه‌ی اخیر نتوانسته‌اند درصد زنده ماندن این بیماران را بهبود بخشند (۲) و همچنین استفاده از این درمان‌ها باعث بروز عوارض جانبی شدید حتی در بعضی موارد منجر به محدودیت ادامه‌ی درمان می‌گردد. با توجه به موارد مذکور مطالعات بر روی مواد طبیعی به منظور دستیابی به ترکیباتی با خاصیت ضدسرطانی هدفمند (علیه سلول‌های توموری نه همه‌ی سلول‌های بدن) و پتانسیل سمیت سلولی و عوارض جانبی کمتر صورت گرفته است (۱۴).

تحقیق بر روی داروهای ضدسرطانی از منابع طبیعی (۱۵) در سال ۱۹۶۰ و با کار بر روی پودوفیلوکسین و مشتقات آن که از گیاه شاهپسند به دست آمده شروع شد.

مؤسسه ملی سرطان آمریکا در حدود ۳۵ هزار نمونه گیاه از ۲۰ کشور دنیا را جمع‌آوری کرده و در حدود ۱۱۴ هزار عصاره‌ی گیاهی را برای فعالیت ضدسرطانی مورد غربالگری قرار داده است (۱۶).

در حال حاضر ترکیبات به دست آمده از گیاهان به عنوان یکی از منابع مهم داروهای شیمی درمانی مطرح می‌باشند. از جمله‌ی این داروها وین بلاستین، وین کریستین،کامپتوتاسین و تاکسول می‌باشد (۱۷).

بنفشه یکی از اعضای خانواده‌ی Violaceae گیاه بومی ایران است. گزارش شده که این گیاه خواص درمانی متعددی شامل خواص ضد التهابی (۱۷)، ضد میکروبی (۱۸)، آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی دارد (۱۹). در مطالعه‌ی انجام شده توسط صادق‌نیا و همکاران (۲۰) فعالیت سلول‌کشی عصاره‌ی بوتانولی و اتیل استاتی بنفشه علیه نوروبلاستوما و سرطان دهانه‌ی رحم به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که بنفشه حاوی ترکیبات سیکلوپپتیدی فراوانی است که خاصیت کشندگی سلولی (cytotoxicity) بالایی دارند (۲۱). سیکلوپپتیدها گروهی از ترکیبات گیاهی هستند که بین ۲۸-۳۲ اسید آمینه دارند و قادر هستند تا اثرات گوناگونی مانند مهار تکثیر سلولی و انقباض رحمی ایجاد کنند (۲۱-۲۲). مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که سیکلوتیدهای جدا شده از بنفشه علیه

سلول‌های سرطانی U251 (گلیوبلاستوما)و MDA-MA-231 (سرطان پستان) و BEL-7402 (هپاتوما) مؤثر هستند (۲۳-۲۴) سیکلوتیدها دارای خاصیت ضد سرطانی، ضد ویروس ایدز و همچنین دارای فعالیت همولیزی در محیط آزمایشگاه هستند (۲۴). این مولکول‌ها کوچکتر از اغلب پروتئین‌ها هستند و پایداری بالا، آن‌ها را برای فرموله کردن به عنوان دارو مناسب کرده است (۲۵). رایس ایوانز و همکاران (۲۶) تأثیر عصاره آبی- الکلی بنفشه بر تکثیر سلول‌های سرطان گردن رحم را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که مواد مؤثره در فراکسیون‌های اتیل‌استاتی و تا حدی در فراکسیون‌های ان- بوتانولی آن قرار دارند. به دلیل فلاونوئید و سایر ترکیبات فنولی موجود در بنفشه گمان می‌رود که این گیاه منبع بسیار مناسبی از مواد آنتی‌اکسیدان باشد.

با توجه به موارد مذکور شامل شکست درمان‌های معمول اسکوآموس سل کارسینومای دهانی و عدم بهبود پیش‌آگهی این بیماری در طی چهار دهه‌ی اخیر و همچنین بروز عوارض جانبی شدید به دنبال این درمان‌ها، هدف از این مطالعه بررسی اثر مهار رشد و سمیت سلولی عصاره‌ی گیاه بنفشه با پتانسیل اثر انتخابی بر رده سلول‌های بدخیم در مقایسه با سلول‌های نرمال بود.

فرضیه صفر این مطالعه عبارت است از عصاره‌ی بنفشه بر هیچ کدام از سلول‌های بدخیم و نرمال اثر مهار رشد و سمیت سلولی ندارد و فرضیه یک آن در صورت دارا بودن این خاصیت، اثر آن بر رده‌ی سلولی اسکوآموس سل کارسینومای مشابه با سلول نرمال است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی و آزمایشگاهی بود. مراحل انجام کار شامل تهیه‌ی عصاره‌ی گیاهی، کشت سلولی و بررسی مهار رشد سمیت سلولی با روش MTT بود که به شرح زیر است:

تهیه عصاره‌ی گیاهی:

برای تهیه عصاره‌ی گیاهی ابتدا گیاه بنفشه به مدت ۳ روز در دمای آزمایشگاه خشک شد. سپس گیاه خشک شده (۳۰۰ گرم) در هاون به صورت پودر درآمد. پس از آن پودر گیاه بنفشه و ان-هگزان (CH3(CH2)4CH3) (Sigma, Germany) ترکیب شد. عصاره‌ی گیاه توسط دستگاه دوار تقطیر (VarghaTajhiz, Iran) در خلأ به دست آمد. این عمل در حدود ۲۴ ساعت به طول انجامید. پس از عصاره‌گیری عمل حذف حلال با استفاده از دستگاه Rota Vapor (R300, BUCHI, Switzerland) انجام گرفت. طی این عمل حلال تبخیر شد و عصاره تغلیظ شد. پودر باقی مانده از مرحله‌ی قبل در کلروفرم (CHCl3) (Sigma, Germany) حل شد تا فراکشن کلروفرمی تهیه گردید.

کشت سلولی:

رده‌ی سلولی KB (KERATIN-forming Based on Isoenzym Pattern- اسکواموس سل کارسینومای دهانی) و HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells- سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت DMEM(Dulbecco's Modified Eagle'smedium)، (Merck, Germany) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ال-گلوتامین کشت داده شد.

سپس سلول‌ها در انکوباتور ۵٪ CO2 ، (HF212UV, Heal Force, China) نگهداری شده و محیط کشت هر ۳ روز یک بار کشت مجدد داده شد.

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT:

جهت بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌ی گیاهی از روش نورسنجی با استفاده از روش MTT (Sigma, Germany) استفاده شد. این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول زنده استوار است که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌کند. این کریستال‌های غیر محلول در حلال دی متیل سولفوکساید (Valhoma, Tulsai, USA) حل شده و سپس به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفتند. در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه (Gene fanavaran, Iran)، ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی ریخته شد. سپس ۲۰

میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به چاهک‌ها اضافه شده و حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. یک چاهک حاوی محیط کشت و ۵٪ DMSO (Dimethyl sulfoxide)، (Sigma, Germany)، بدون عصاره به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و یک چاهک حاوی محیط کشت به تنهایی به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۵٪ CO_2 قرار داده شد و دمای آن بر روی ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از MTT به هر چاهک اضافه شده و این بار به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به منظور حل کردن دانه‌های فورمازان اضافه شده و در نهایت جذب هر نمونه در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر، (Biotech, USA)، اندازه‌گیری شد. درصد بقای سلولی در چاهک کنترل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده و درصد بقای سلولی در چاهک‌های مورد آزمایش از فرمول زیر محاسبه شد. غلظتی از عصاره‌ی گیاهی که حیات سلولی را به نصف برساند به عنوان IC50 درنظرگرفته شد.

$$\text{درصد بقای سلولی} = \frac{\text{جذب بلانک} - \text{جذب سلول‌های تیمار شده}}{\text{جذب بلانک} - \text{جذب کنترل منفی}} * 100$$

تمامی مراحل فوق بر دو رده‌ی سلولی نرمال و سرطانی سه بار تکرار شد.

نتایج وارد نرم‌افزار spss نسخه‌ی ۱۲ گردید. برای بررسی همزمان اثر غلظت عصاره‌ی بنفشه و نوع سلول (سلول نرمال– سلول بدخیم) بر درصد سلول‌های زنده باقی مانده از آنالیز واریانس دوطرفه (Two Way ANOVA) استفاده گردید. برای بررسی اثر غلظت عصاره‌ی گیاهی بر درصد سلول‌های زنده باقی مانده در هر رده‌ی سلولی به تفکیک آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و آنالیز واریانس دوطرفه در سطح معنی‌داری $\alpha = ۰/۰۵$ انجام گرفت.

یافته‌ها

برای بررسی اثر غلظت عصاره‌ی بنفشه و نوع سلول (سلول نرمال– سلول بدخیم) بر درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده از آنالیز واریانس دوطرفه استفاده گردید. نتایج نشان داد درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده با غلظت‌های مختلف عصاره ارتباط معنی‌دار دارد ($p\ value < ۰/۰۰۱$)، در حالی که با نوع سلول ارتباط معنی‌دار ندارد ($p\ value = ۰/۲۶$).

برای بررسی اثر غلظت عصاره‌ی گیاهی بر درصد سلول‌های زنده باقی مانده در هر رده‌ی سلولی، به تفکیک آنالیز واریانس یک‌طرفه و آنالیز واریانس دوطرفه انجام گرفت (جدول ۱ و جدول۲).

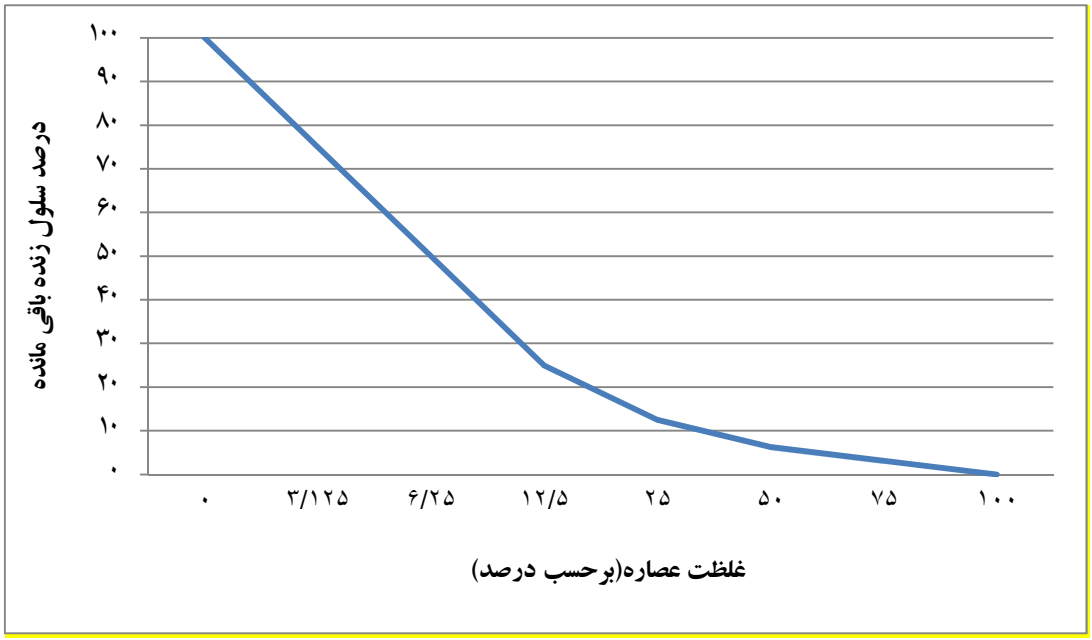
همچنین در نمودار ۱ و ۲ درصد سلول‌های زنده باقی مانده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره بنفشه در رده سلولی نرمال و سرطانی نمایش داده شده است.

جدول۱: میانگین و انحراف معیار درصد سلول‌های زنده باقی مانده نرمال پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف گیاه بنفشه

غلظت عصاره (برحسب درصد)	میانگین درصد سلول‌های زنده باقی مانده	انحراف معیار
۱۰۰	۶۸/۵۸	۵/۴۶
۷۵	۷۶/۹۴	۴/۶۳
۵۰	۸۲/۹۲	۲/۴۱
۲۵	۸۴/۷۵	۲/۲۸
۱۲/۵	۹۱/۰۸	۶/۲۴
۶/۲۵	۹۴/۷۷	۵/۳۳
۳/۱۲۵	۹۸/۰۳	۱/۹۳
۰	۱۰۰	۰

جدول۲: میانگین و انحراف معیار درصد سلول‌های زنده باقی مانده سرطانی پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف گیاه بنفشه

غلظت عصاره (برحسب درصد)	میانگین درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده	انحراف معیار
۱۰۰	۵۸/۵	۵/۴۲
۷۵	۷۵/۳۲	۳/۷۴
۵۰	۸۷/۲۱	۴/۰۵
۲۵	۹۳/۵۹	۲/۰۵
۱۲/۵	۹۶/۶۲	۱/۰۴
۶/۲۵	۹۷/۱۵	۱/۶
۳/۱۲۵	۹۹/۲۷	۰/۴۲
۰	۱۰۰	۰

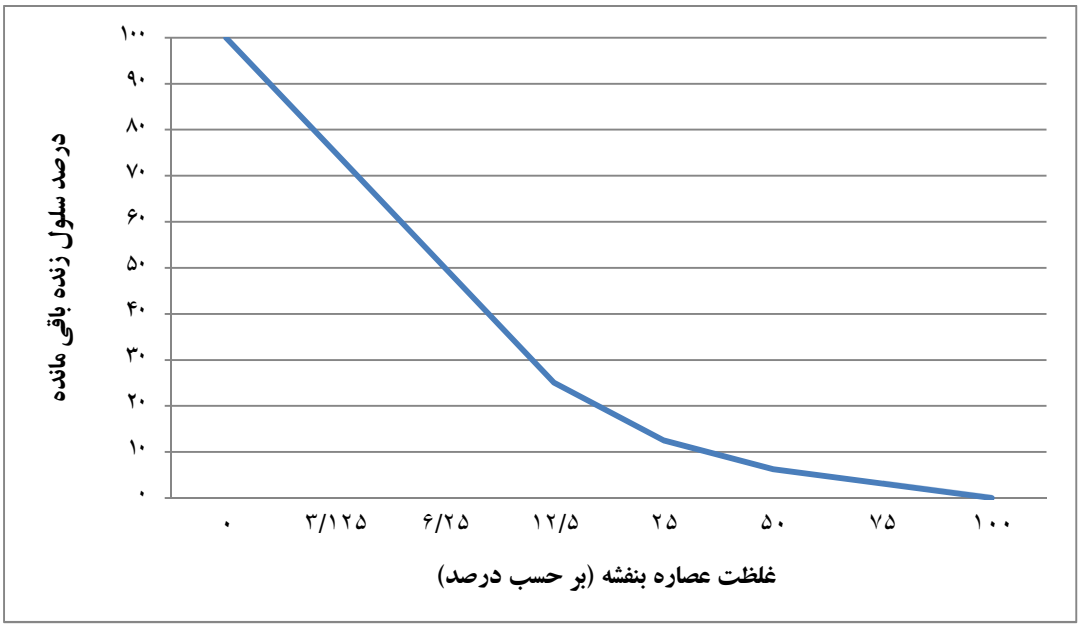


نمودار۱: نمودار درصد سلول‌های زنده باقی مانده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره‌ی بنفشه در رده‌ی سلولی نرمال

طبق نمودار ۱ بین درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده و غلظت‌های مختلف عصاره در رده‌ی سلولی طبیعی رابطه‌ی معکوس (تابع نمایی) وجود دارد که به معادله خط $y = \frac{1}{0.011^x}$ که در آن y معادل درصد سلول‌های زنده باقی مانده و x معادل غلظت‌های مختلف عصاره می‌باشد، می‌توان درصد سلول‌های زنده باقی مانده را پس از قرارگیری در معرض هر غلظتی از عصاره محاسبه نمود.

طبق نمودار ۲ بین درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده و غلظت‌های مختلف عصاره در رده‌ی سلولی بدخیم رابطه‌ی معکوس (تابع نمایی) وجود دارد که با معادله خط $y = \frac{1}{0.01^x}$ که در آن y معادل درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده و x معادل غلظت‌های مختلف عصاره می‌باشد، می‌توان درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده‌ی بدخیم را پس از قرارگیری در معرض هر غلظتی از عصاره محاسبه نمود.

برای نمایش اختلاف آماری درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده در غلظت‌های مختلف عصاره در هر رده‌ی سلولی به تفکیک داده‌ها به طور خلاصه در جداول ۳ و۴ حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) آورده شده است. بر طبق این دو جدول درصد سلول زنده‌ی باقی مانده در غلظت‌هایی که در یک ستون نمایش داده شده‌اند اختلاف آماری معنی‌دار ندارند (p value > ۰/۰۵) و در صورتی که فقط در ستون‌های مختلف باشند اختلاف آماری معنی‌دار دارند (p value < ۰/۰۵).



نمودار ۲. نمودار درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره‌ی بنفشه در رده‌ی سلولی بدخیم

جدول۳: جمع‌بندی اختلاف آماری درصد سلول زنده‌ی باقی مانده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره بنفشه در رده سلولی نرمال با روش توکی (سطح معنی‌داری = ۰/۰۵)

غلظت عصاره‌ی بنفشه (بر حسب درصد)	۱	۲	۳	۴
۱۰۰	۶۸/۵۸			
۷۵	۷۶/۹۴	۷۶/۹۴		
۵۰	۸۲/۹۲	۸۲/۹۲	۸۲/۹۲	
۲۵	۸۴/۷۵	۸۴/۷۵	۸۴/۷۵	۸۴/۷۵
۱۲/۵		۹۱/۰۸	۹۱/۰۸	۹۱/۰۸
۶/۲۵			۹۳/۷۷	۹۳/۷۷
۳/۱۲۵			۹۸/۰۳	۹۸/۰۳
کنترل				۱۰۰/۰۰

اعداد در هرستون از نظر درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره‌ی بنفشه مشابه هستند.

جدول۴: جمع‌بندی اختلاف آماری درصد سلول زنده باقی مانده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره‌ی بنفشه در رده‌ی سلولی سرطانی با روش توکی (سطح معنی‌داری = ۰/۰۵)

غلظت عصاره‌ی بنفشه (بر حسب درصد)	۱	۲	۳	۴
۷۵	۵۸/۵۰۸۳			
۵۰		۷۵/۳۲۴۱		
۲۵			۸۷/۲۱۳۹	
۱۲/۵			۹۳/۵۹۶۱	۹۳/۵۹۶۱
۶/۲۵			۹۶/۶۲۶۱	۹۶/۶۲۶۱
۳/۱۲۵			۹۷/۱۵۶۴	۹۷/۱۵۶۴
کنترل				۹۹/۲۷۷۸
				۱۰۰/۰۰۰۰

اعداد در هرستون از نظر درصد سلول‌های زنده‌ی باقی مانده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف عصاره‌ی بنفشه مشابه هستند.

بحث

فرضیه‌ی صفر این مطالعه عبارت بود از: «اولاً» عصاره‌ی گیاه بنفشه بر هیچ کدام از دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش شامل سلول‌های بدخیم اسکوآموس سل کارسینوما و سلول طبیعی اثر مهار رشد و سمیت سلولی ندارد و «ثانیاً» در صورت دارا بودن این خاصیت، اثر آن بر رده‌ی سلولی اسکوآموس سل کارسینوما مشابه سلول طبیعی است. طی این مطالعه قسمت اول فرضیه‌ی صفر رد و قسمت دوم فرضیه‌ی صفر تأیید شد.

به طوری که نتایج نشان داد عصاره‌ی بنفشه باعث مهار رشد و سمیت سلولی در هر دو رده‌ی سلولی بدخیم اسکوآموس سل کارسینوما و طبیعی می‌شود ولی خاصیت کشندگی سلولی بر رده‌ی سلول تومورال اسکوآموس سل کارسینوما با رده سلول طبیعی (فیبروبلاستموش) مشابه است.

به نظر می‌رسد مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه‌ای است که اثر ضدتوموری و کشندگی سلولی عصاره‌ی گیاه بنفشه را بر رده‌ی سلولی اسکواموس سل کارسینومای دهانی مورد بررسی قرار می‌دهد و تاکنون مطالعه‌ی مشابهی در این زمینه انجام نشده است، ولی در تعدادی از مقالات اثر مهار رشد و سمیت سلولی عصاره‌ی این گیاه بر تومورهای دیگر انجام شده است (۲۷-۲۹).

تانگ (Tang) و همکاران (۲۷) در ۲۰۱۰ اثرکشندگی سلولی ترکیبات سیکلوتیدی مشتق از گیاه بنفشه بر رده‌های سلولی U251 (گلیوبلاستوما) و A549 (کارسینومای ریه) و DU145 (سرطان پروستات) و MDA-MA-231 (سرطان پستان) و BEL-7402 (هپاتوما) را نشان دادند.

همچنین در مطالعه‌ی صادق‌نیا و همکاران (۲۰) فعالیت کشندگی سلولی عصاره‌ی بوتانولی و اتیل استاتی عصاره‌ی بنفشه بر سلول‌های بدخیم دهانه رحم به اثبات رسیده است. سوانگارد و همکاران (۲۸) در سال ۲۰۰۴ نیز اثرسمیت سلولی سه سیلکوتید مشتق از عصاره‌ی بنفشه را بر رده سلولی A549 (کارسینومای ریه) وDU145 (سرطان پروستات) و MDA-MA-231 (سرطان پستان) و BEL-7402 (هپاتوما) نشان دادند.

در مطالعه‌ی هرمان و همکاران (۲۹) در سال ۲۰۰۸ نیز گیاه بنفشه با دارا بودن مقادیر زیاد سیلکوتید به عنوان گیاهی با خاصیت سمیت سلولی و مهار رشد سلول‌های بدخیم معرفی گردید.

نتایج تمامی مطالعات مذکور مشابه مطالعه حاضر نشان داد که گیاه بنفشه باعث مهار رشد رده‌های سلولی بدخیم می‌شود. در مطالعه‌ی تویو و همکاران (۳۰) نشان داده شد که گیاه بنفشه به میزان زیادی حاوی ترکیبات با خاصیت کشندگی سلولی و ضدتوموری است. از جمله‌ی این ترکیبات ساپونین (saponins)، موسیلاژ (mucilage)، سیکلوتید (cyclotides) و فلاونوئیدها (flavonoids) هستند. در بین ترکیبات مذکور شواهد حاضر بیشترین نقش آنتی‌توموراال را به فلاونوئیدها نسبت می‌دهند. وکیس و همکاران (۳۱) در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که دو ترکیب فلاونوئید موجود در گیاه بنفشه (V.ticolor) باعث مهار کردن آزوکسی متانول (azoxymethanol) می‌شود. آزوکسی متانول باعث القای نئوپلازی می‌شود و در نتیجه فلاونوئیدهای موجود در بنفشه باعث مهار بدخیمی می‌شوند.

بر خلاف مطالعات مذکور، مرتضوی و قربانی (۳۲) در سال ۲۰۱۱ اثر ضد توموری گیاه بنفشه بر نوروبلاستوما را در محیط آزمایشگاهی بررسی کردند، که در مطالعه‌ی آن‌ها نشان داده شد عصاره‌ی هیدروالکلی این گیاه بر نوروبلاستوما اثر کشندگی ندارد. در صورتی که حلال عصاره‌ی اتیل استات یا ان-بوتانول (N-butanol) باشد اثر ضدتوموری بر این رده سلولی دارد که دلیل احتمالی این موضوع وجود درصد بیشتر ترکیبات مؤثره‌ی آنتی‌توموری در این دو نوع حلال نسبت به عصاره‌ی هیدروالکلی می‌باشد.

از طرف دیگر سافردینی و همکاران (۳۳) که خاصیت ضدتوموری ۳۵۱ گونه گیاه جنگل‌های آمازون و آتلانتیک بر رده‌ی سلولی سرطان پستان را مورد بررسی قرار دادند، نشان داده شد که فقط عصاره‌ی ۱۱ گیاه دارای خاصیت ضدتوموری می‌باشد، یکی از این یازده گیاه عصاره‌ی گیاه بنفشه بود که دارای خاصیت کشندگی بیشتری بر رده‌ی سلولی سرطان پستان در مقایسه با رده‌ی سلولی طبیعی بود. نتایج مطالعه‌ی مذکور مخالف نتیجه مطالعه‌ی حاضر می‌باشد، به طوری که در بررسی ما عصاره‌ی بنفشه دارای اثر مهار رشد و کشندگی سلولی انتخابی بر سلول‌های توموراال (اسکواموس سل کارسینومای دهانی) نسبت به سلول‌های نرمال (فیبروبلاست موش) نبود. از علل این تفاوت می‌توان به تفاوت در رده‌ی سلولی مورد آزمایش اشاره کرد، به نحوی که در مطالعه‌ی حاضر رده‌ی سلولی اسکوآموس سل کارسینوما و در مطالعه‌ی سافردینی و همکاران (۳۳) رده سلولی بدخیمی پستان مورد ارزیابی قرار گرفته است. بیان شدن ژن‌های مختلف در رده‌های سلولی متنوع می‌تواند باعث حساسیت متفاوت به مواد سمی یکسان گردد.

از محدودیت پژوهش حاضر این است که علی رغم این که روشMTT برای بررسی کشندگی سلولی تحت تأثیر یک ماده به عنوان اولین تست آزمایشگاهی مطرح می‌باشد ولی با این روش فقط کشندگی سلولی را می‌توان مورد بررسی قرار داد و این که کدام قسمت سلول از جمله غشای سیتوپلاسمی، DNA و میتوکندری تحت تأثیر قرار گرفته است که منجر به مرگ سلولی شده، قابل بررسی نیست. همچنین با این روش افتراق نکروز از آپوپتوز امکان‌پذیر نیست. برای رفع محدودیت‌های مذکور استفاده از روش میکرواری (Micro Array) (۳۴) برای افتراق نکروز از آپوپتوز و همچنین بررسی دلیل مرگ سلولی (تحت تأثیر قرارگرفتن کدام قسمت سلول) تحت تأثیر ماده‌ی مورد آزمایش پیشنهاد می‌گردد. البته همان‌طور که ذکر گردید پس از اثبات خاصیت کشندگی سلولی تحت تأثیر یک ماده خاص با روش MTT روش‌های پیشرفته‌تر از جمله میکرواری (Micro Array) مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد خاصیت کشندگی سلولی عصاره‌ی بنفشه بر رده‌ی سلولی توموراال اسکوآموس سل کارسینوما با رده طبیعی مشابه است. بر اساس این مطالعه عصاره‌ی بنفشه ممکن است نتواند به عنوان ماده‌ی طبیعی با خاصیت ضد بدخیمی هدفمند و خاصیت عوارض جانبی

کمتر علیه اسکوآموس سل کارسینوما به کار رود، در هر حال انجام مطالعات آزمایشگاهی دیگر با روش‌های RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) پیشنهاد می‌گردد.

* این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۳۹۴۵۸۴ بوده و کلیه حقوق این طرح برای دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان محفوظ است.

References

1. Lacko M, Braakhuis BJ, Sturgis EM, Boedeker CC, Suarez C, Rinaldo A, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2014; 89(1):38-48.
2. Zlotogorski- Hurvitz A, Dayan A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. [Nutraceuticals in the combat against oral cancer]. Refuat Hapeh Vehashinayim 2014; 31(2):8-13, 84.
3. Castillo M, Scheen A, Lefebvre PJ, Luyckx AS. Insulin-stimulated glucose disposal is not increased in anorexia nervosa. J Clin Endocrinol Metab 1985; 60(2):311-4.
4. Schmidt BL, Dierks EJ, Homer L, Potter B. Tobacco smoking history and presentation of oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62(9):1055-8.
5. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. Br J Cancer 2014; 112(3):580-93.
6. Ang KK, Sturgis EM. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. Semin Radiat Oncol 2012; 22(2):128-42.
7. Han Y, Smith MT. Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). Front Pharmacol 2013;4(1):156.
8. Tamargo J, Caballero R, Delpon E. Drug-induced atrial fibrillation: does it matter? Discov Med. 2012; 14(78):295-9.
9. Boussios S, Pentheroudakis G, Katsanos K, Pavlidis N. Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: incidence, clinical presentation and management. Ann Gastroenterol. 2012;25(2):106-18.
10. Gibson RJ, Keefe DM. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. Support Care Cancer. 2006; 14(9):890-900.
11. Trueb RM. Chemotherapy-induced alopecia. SeminCutan Med Surg 2009; 28(1):11-4.
12. Epstein JB, Schubert MM. Oropharyngeal mucositis in cancer therapy. Review of pathogenesis, diagnosis, and management. Oncology (Williston Park). 2003; 17(12):1767-79.
13. Omoti AE, Omoti CE. Ocular toxicity of systemic anticancer chemotherapy. Pharm Pract (Granada) 2006; 4(2):55-9.
14. Lin HY, Thomas JL, Chen HW, Shen CM, Yang WJ, Lee MH. In vitro suppression of oral squamous cell carcinoma growth by ultrasound-mediated delivery of curcuminmicroemulsions. Int J Nanomedicine 2012; 7(1):941-51.
15. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J ethnopharmacol 2005; 100(1-2):72-9.
16. Hassan LE, Ahamed MB, Majid AS, Baharetha HM, Muslim NS, Nassar ZD, et al. Correlation of antiangiogenic, antioxidant and cytotoxic activities of some Sudanese medicinal plants with phenolic and flavonoid contents. BMC complementary and alternative medicine 2014; 14(2):406.
17. Toiu A, Pârvu AE, Oniga I, Tămaş M. Evaluation of anti-inflammatory activity of alcoholic extract from Viola tricolor. Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici siNaturalisti din Iasi 2006; 111(2):525-9.
18. Witkowska- Banaszczak E, Bylka W, Matławska I, Goślińska O, Muszyński Z. Antimicrobial activity of Viola tricolor herb. Fitoterapia 2005; 76(5):458-61.
19. Vukics V, Kery A, Bonn GK, Guttman A. Major flavonoid components of heartsease (Viola tricolor L.) and their antioxidant activities. Anal Bioanal Chem 2008; 390(7):1917-25.
20. Sadeghnia HR, GhorbaniHesari T, Mortazavian SM, Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Ghorbani A. Viola tricolor Induces Apoptosis in Cancer Cells and Exhibits Antiangiogenic Activity on Chicken Chorioallantoic Membrane. Bio Med Res Int 2014; 2014(1):1-8.
21. Saether O, Craik DJ, Campbell ID, Sletten K, Juul J, Norman DG. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. Biochemistry 1995; 34(13):4147-58.
22. Daly NL, Rosengren KJ, Craik DJ. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. Advanced drug delivery reviews 2009; 61(11):918-30.

23. Tang J, Wang CK, Pan X, Yan H, Zeng G, Xu W, et al. Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from Viola tricolor. Peptides 2010; 31(8):1434-40.
24. Mulvenna JP, Sando L, Craik DJ. Processing of a 22 kDa precursor protein to produce the circular protein tricyclon A. Structure. 2005; 13(5):691-701.
25. Henriques ST, Craik DJ. Cyclotides as templates in drug design. Drug discovery today. 2010; 15(1-2):57-64.
26. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends plant sci. 1997; 2(4):152-9.
27. Tang J, Wang CK, Pan X, Yan H, Zeng G, Xu W, et al. Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from Viola tricolor. Peptides 2010; 31(8):1434-40.
28. Svangard E, Goransson U, Hocaoglu Z, Gullbo J, Larsson R, Claeson P, et al. Cytotoxic cyclotides from Viola tricolor. J Nat Prod 2004;67(2):144-7.
29. Herrmann A, Burman R, Mylne JS, Karlsson G, Gullbo J, Craik DJ, et al. The alpine violet, Viola biflora, is a rich source of cyclotides with potent cytotoxicity. Phytochemistry 2008; 69(4):939-52.
30. Toiu A, Muntean E, Oniga I, Vostinaru O, Tamas M. Pharmacognostic research on Viola tricolor L. (Violaceae). Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.2009;113(1):264-7.
31. Vukics V, Kery A, Bonn GK, Guttman A. Major flavonoid components of heartsease (Viola tricolor L.) and their antioxidant activities. Anal Bioanal Chem. 2008; 390(7):1917-25.
32. Mortazavian SM, Ghorbani A. Antiproliferative effect of viola tricolor on neuroblastoma cells in vitro. Aust J Herbal Med. 2012; 24(3):93-6.
33. Suffredini IB, Paciencia ML, Frana SA, Varella AD, Younes RN. In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. Die Pharmazie 2007; 62(10):798-800.
34. Ball CA, Sherlock G, Parkinson H, Rocca-Sera P, Brooksbank C, Causton HC, et al. Standards for microarray data. Science. 2002; 298(5593):539.

Investigating the anti-proliferative effect and cytotoxicity of violet extract against SCC cells in vitro

Heidar Khademi[1]
Zahra Golestannejad[2]
Mahdi Sadeghi[3]

1. Associate Professor, Dental Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Medicine, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2. **Corresponding Author:** Assistant Professor, Dental Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Medicine, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Email: dr_zgolestan@yahoo.com
3. Dental Student, Dental Students Research Center, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Abstract

Introduction: Malignancies are the main cause of death in developed countries and the second cause of death in developing countries. Head and neck squamous cell carcinoma is the sixth most common cancer worldwide and standard treatments have failed to improve its survival rate in the past four decades. In addition, these treatment modalities give rise to various complications. Recently, research has focused on natural substances with anti-neoplastic properties that are specifically directed against malignant cells and have less potential for complications. The aim of this study was to evaluate the selective inhibitory and cytotoxic effects of violet extract on malignant cells compared to normal cells.

Materials & Methods: In this in vitro study, photometry and optical density (OD) techniques were used for MTT test to assess the cytotoxicity of violet extract at a wavelength of 560 nm using an ELISA reader. The cell survival rate was calculated by dividing the difference of blank OD in the treated cells by the difference of blank OD in control cells. Data were analyzed with two-way ANOVA to evaluate the concomitant effect of violet extract concentration and cell type on the percentage of residual viable cells; one-way and two-way ANOVA were used to evaluate the effect of the concentration of the extract on the percentage of residual viable cells separately for each cell line by using SPSS.

Results: The results showed a significant relationship between the percentage of residual viable cells and the different concentrations of the extract (p value <0.001); however, there was no significant relationship between the violet extract concentration and cell type (p value > 0.26).

Conclusion: Based on the results, the cytotoxicity of violet extract on malignant cells (SCC) was similar to that on normal cells. Therefore, violet extract may not be useful as a natural substance, with less side effects, to selectively inhibit malignant cells.

Key words: Toxicity, SCC, Violet.

Received: 15.9.2016 **Revised**: 17.11.2016 **Accepted:** 22.11.2016

How to cite: Khademi H, Golestannejad Z, Sadeghi M. Investigating the anti-proliferative effect and cytotoxicity of violet extract against SCC cells in vitro. J Isfahan Dent Sch 2017; 13(1): 1-11.