فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال یازدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۷

اثر عصاره آبی سیر (*Allium sativum* L.) بر زنده مانی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) و سلول‌های غیر سرطانی فیبروبلاست موش (L929)

زهرا حسن زاده[۱]، المیرا میکائیلی آگاه[۱*]، اسدالله اسدی[۲]، کبری باقری ولمی[۳]

[۱] گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۳] گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

[*] Email: e.mikaeili@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۳

چکیده

سیر در جهان بعنوان یک ماده غذایی با خواص درمانی زیادی بر انسان طی قرن‌ها شناخته شده است. هدف این مطالعه، مقایسه اثر سمیت سلولی و ضد تکثیری عصاره آبی سیر بر سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) و غیر سرطانی طبیعی (L929) می‌باشد. پس از کشت و تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت، مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس و اثر سمی عصاره با روش MTT (۳- ۴، ۵ دی متیل تیازول ۲ یل ۵، ۲ دی فنیل تترازولیوم) بررسی گردید. مشاهدات میکروسکوپی مبنی بر عدم تغییر در هر دو رده سلولی در ۲۴ ساعت بود. این تغییرات پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت در سلول‌های سرطانی ظاهر و پس از ۷۲ ساعت تشدید شد و در سلول‌های سالم تغییر چندانی مشاهده نگردید. همزمان نتایج آزمون MTT نشان داد که میزان مرگ در ۲۴ و ۴۸ ساعت در دوزهای بالا معنا دار ($P<0.001$) بود و در ۷۲ ساعت بسیار شدت یافت و میزان بقا به ۴۸٪ در بالاترین دوز رسید. در حالیکه در ۲۴ و ۴۸ ساعت شاهد مرگ معناداری در سلول‌های غیر سرطانی نبودیم اما در دوزهای بالای ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۷۲ ساعت مرگ بصورت معنی‌دار ($P<0.001$) افزایش یافت اما از ۱۹٪ تجاوز نکرد. بنابراین، عصاره آبی سیر اثر کشندگی بیشتری بر سلول‌های سرطانی سینه نسبت به سلول‌های طبیعی دارد و می‌توان از آن در پیشگیری از سرطان یا به عنوان ماده مکمل در شیمی درمانی در آینده بهره جست.

کلیدواژه‌ها: سلول سرطان سینه، سلول فیبروبلاست موش، عصاره آبی سیر، سمیت سلولی.

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی نئوپلاستیک زنان در دنیا است و به عنوان مهمترین دلیل مرگ ناشی از سرطان خانم‌ها مطرح می‌باشد. شیوع سالانه این بدخیمی در دنیا رو به افزایش است. اما میزان شیوع آن در کشورهای دنیا متفاوت گزارش شده است [۶،۵].

سلول‌های MCF-7 (رده سلولی انسانی سرطان سینه)، رده‌سلولی بسیار مناسب برای مطالعات *in vitro* در مورد سرطان سینه محسوب می شوند و برای اولین بار در سال۱۹۷۰ از بافت سینه خانم ٦٩ ساله مبتلا به سرطان سینه جداسازی شدند. سلول‌های MCF-7 سلول‌های شبه اپی تلیالی مشتق شده از سرطان پستان هستند [۱۲].

علی رغم تحقیقات بسیار در مورد سرطان و درمان آن، هنوز هم این بیماری به عنوان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات سلامت جوامع انسانی مطرح می‌باشد. با توجه به این که داروهای شیمیایی مورد استفاده در درمان سرطان، علاوه بر ایجاد مقاومت دارویی، دارای اثرات جانبی نیز می‌باشند، مطالعه و بررسی عواملی با منشاء طبیعی، مانند ترکیبات به دست آمده از گیاهان که اثرات مضر کمتری دارند، یکی از مهمترین اهداف تحقیق در حوزه درمان سرطان، تلاش برای یافتن داروهای مؤثرتر با عوارض جانبی با استفاده از گونه‌های بومی رایج می‌باشد [۱۹،۱۳].

سیر با نام علمی *Allium sativum*، گیاهی از راسته مارچوبه سانان از تیره نرگسیان و زیر تیره پیازیان و سرده والک است. سیر یکی از مهم‌ترین گونه‌های خانواده *Alliaceae* می‌باشد [۱۱]. در حال حاضر به‌عنوان جلوگیری‌کننده و درمان‌کننده بیماری‌های قلبی عروقی به‌وسیله کاهش فشار کلسترول خون، عامل ضد باکتری و پیشگیری کننده سرطان استفاده می‌شود. امروزه اشکال دارویی سیر به شکل قرص، کپسول، شربت و روغن موجود می‌باشند [٢٠،٤].

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده اند که ارتباط معکوسی میان مصرف سیر و بروز سرطان وجود دارد. اثرات ضد سرطانی ترکیبات موجود در سیر مربوط به اثرات مهاری و سمیت سلولی مستقیم آنهاست و این اثرات با استفاده از مدل‌های سرطانی در حیوانات مختلف و در مطالعات *in vitro*، با کشت رده‌های سلول‌های سرطانی نشان داده شده است [۲]. از آنجایی که اغلب داروهای شیمی درمانی در کنار اثرات درمانی و سمیتی که بر سلول‌های سرطانی دارند دارای اثر کشندگی و سوء نیز بر سلول‌های سالم نیز دارند. بنابراین یافتن داروهایی که اثرات سوء کمتری بر سلول‌های سالم داشته باشند در درمان سرطان مناسب‌تر به نظر می‌رسند. بنابراین بر آن شدیم که در این مطالعه به بررسی مقایسه‌ای اثرات کشندگی عصاره آبی سیر بر روی سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 و سلول‌های طبیعی و سالم فیبروبلاست موش L929 بپردازیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی است و به روش زیر انجام شد.

تهیه و آماده سازی عصاره آبی سیر

ابتدا سیر توسط چاقو خرد شده و ۱۰۰ گرم از آن در یک بشر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. مخلوط مذکور توسط دستگاه هموژنایز هم‌زده شد. برای جدا کردن ناخالصی ابتدا از پارچه توری و سپس کاغذ صافی واتمن استفاده شد. مایع صاف شده درون پلیت‌های شیشه‌ای به صورت لایه نازک ریخته شده و در آون سه شب قرار داده شدند تا خشک شوند. جهت تهیه غلظت‌های آزمایش، مقدار مورد نظر از عصاره خشک را وزن نموده و در کمی محیط‌کشت حل شد و سپس با همان محیط کشت به حجم مناسب رسانده شد و در پایان عصاره توسط فیلتر میکروبی ۰/۲۲ میکرونی استریل شد و تا زمان استفاده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

نگهداری شد.

کشت و پاساژ سلولی

در این مطالعه رده سلولی سرطانی سینه MCF-7 و سلول‌های سالم فیبروبلاست موش در پاساژ دوم از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های سرطانی و سلول‌های فیبروبلاستی موش به ترتیب توسط محیط‌کشت RPMI-1640 و DMEM حاوی ۱۰٪FBS، پن/استرپ ۱٪، جنتامایسین ۰/۰۰۱٪ و آمفوتریسین ۰/۰۰۱٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و CO_2 ۵٪ کشت داده شدند. پس از آن که کف فلاسک‌ها حدود ۸۰٪ پر شدند، سلول‌ها توسط Trypsin/EDTA پاساژداده شدند و از تریپان بلو و لام نئوبار برای شمارش سلولی و ارزیابی حیات سلول استفاده شد و سلول های سرطانی و سالم به طور جداگانه با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک در ٦ پلیت ۹٦ خانه‌ای جداگانه کشت شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌های پلیت، سلول‌ها تحت مجاورت با غلظت های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ٤۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی سیر قرار گرفتند و برای هر گروه یک ردیف از چاهک‌های پلیت را به‌عنوان ردیف کنترل در نظر گرفته شد و توسط محیط‌کشت بدون عصاره تیمار شدند. تغییرات مورفولوژیکی و خصوصیات عمومی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس پس از گذشت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. عمل فوق الذکر با سه بار تکرار انجام گرفت.

بررسی اثر سمیت عصاره سیر توسط آزمون MTT

جهت سنجش بقای سلولی و اثر کشندگی عصاره بر رده سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) و سلول‌های سالم فیبروبلاستی موش از روشMTT Assay استفاده شد. در این روش فعالیت متابولیکی سلول‌ها مورد سنجش قرار می‌گیرد. این ماده از نمک‌های تترازولیوم به رنگ زرد و محلول در آب بوده که توسط آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری احیا شده به فرم کریستال‌های فورمازان غیر محلول در سلول‌های زنده رسوب می‌نماید. این کریستال‌ها به رنگ بنفش بوده و میزان تولید کریستال غیر محلول متناسب با فعالیت سلول می‌باشد، از طرفی سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند روند احیای MTT را انجام داده که به‌عنوان سلول زنده در نظر گرفته می‌شود. پس از طی مراحل زیر جذب نوری محلول حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت می‌شود.

پس از گذشت ٤۸،۲٤ و۷۲ ساعت از تیمار سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی در پلیت‌های جداگانه توسط عصاره، محیط کشت هر پلیت خالی و به هرچاهک ۱۰۰µl محیط تازه حاوی ۲۰µl از محلول رنگی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ٤-۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس محتویات داخل چاهک‌ها را با سمپلر خالی شد و DMSO۱۰۰µl به هر خانه اضافه گردید تا فورمازان حاصل حل گردد. پلیت‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر گذاشته تا رنگ محیط به رنگ صورتی مایل به ارغوانی درآید. سپس میزان جذب را در هر خانه توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

آزمون‌های آماری

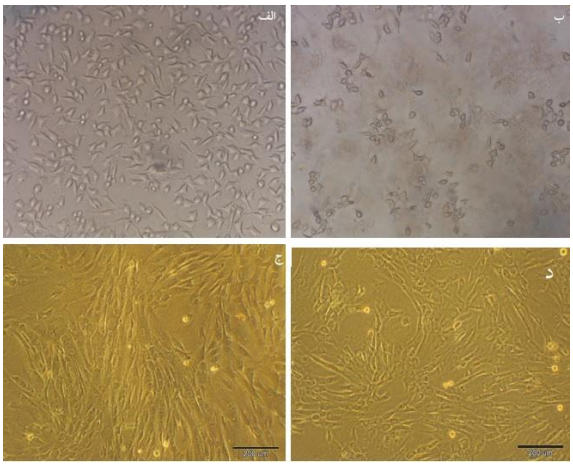
داده‌های حاصل از آزمون MTT، با استفاده از

نرم‌افزار آماری Prism 5 نسخه Demo و آزمون تی تست جهت مقایسه میزان بقای سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی در غلظت‌های مختلف در بازه‌های زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت تجزیه و تحلیل شدند و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از ۳ تکرار گزارش و به صورت نمودار ترسیم شدند. همچنین تفاوت‌ها بین گروه‌های مورد بررسی در سطح $P<0.001$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

بررسی و مقایسه تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها

گروه تیمار و کنترل در هر دو گروه سلولی از نظر ظاهری و مورفولوژیک توسط میکروسکوپ معکوس ارزیابی شدند. تغییر در مورفولوژی سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار با عصاره) در بازه زمانی ٤۸ ساعت در دوزهای ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و این تغییرات ظاهری به طور چشم گیرتر در ۷۲ ساعت پس از تیمار مشهود بودند. در حالیکه ما تغییرات ظاهری خاصی در ۲٤ ساعت مشاهده ننمودیم. بنابراین میتوان گفت که رابطه مستقیمی بین مدت زمان تاثیر عصاره و شدت تغییرات وجود دارد و با افزایش غلظت و زمان تیمار مورفولوژی سلول‌ها تغییر می‌یابد. بطوریکه در غلظت‌های بالا سلول‌ها از حالت دوکی خارج شده و گرد می شوند، درون سلول وزیکوله و هسته تیره رنگ می شود. همچنین اتصالات و ارتباطات بین سلول ها گسسته و سلول‌ها از کف چاهک‌ها جدا می‌شوند. قابل ذکر است که تغییرات مورفولوژیک در سلول‌های طبیعی L929 نسبت به سلول‌های کنترل حتی در غلظت‌های بالای عصاره یعنی ۸۰۰۰ و ۱۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲٤ و ٤۸ ساعت دیده نشد و فقط در ۷۲ ساعت شاهد تغییرات جزئی در دوزهای بالای ۸۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودیم و این تغییرات در مقایسه با سلول‌های سرطانی بسیار کمتر بود (تصویر ۱).



تصویر ۱- عکس میکروسکوپی مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت تیمار با غلظت ۱۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره آبی سیر. الف- سلول های سرطانی MCF-7 گروه کنترل، ب- سلول های سرطانی MCF-7 در حال آپوپتوز، ج- سلول‌های طبیعی فیبروبلاست موش L929 گروه کنترل و د- سلول های طبیعی فیبروبلاست موش L929 تیمار شده.

مقایسه سمیت سلولی عصاره

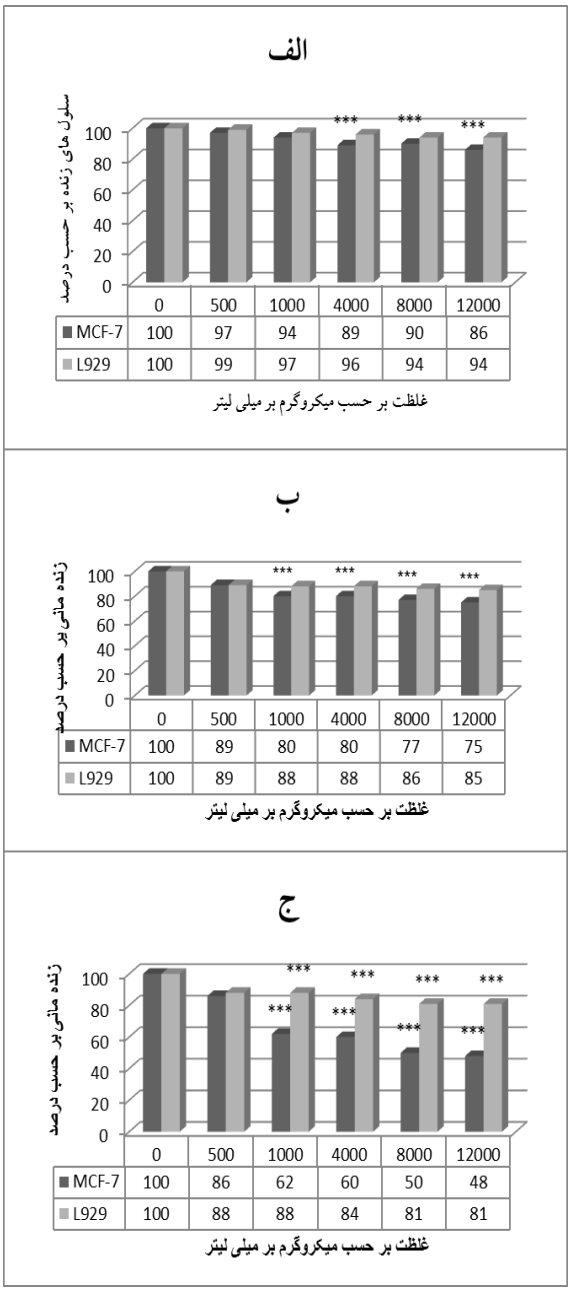
مقایسه میانگین میزان بقاء سلول‌های سرطانی با سلول‌های طبیعی غیر سرطانی تیمار شده با عصاره سیر توسط آزمون MTT نشان داد که سیر از همان ۲٤ ساعت اول در دوزهای ٤۰۰۰، ۸۰۰۰ و ۱۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی معناداری ($P<0.001$) در مقایسه با سلول‌های طبیعی بر سلول‌های سرطانی داشت در حالیکه هیچ اثر سمی بر سلول های نرمال نداشت. پس از گذشت ٤۸ ساعت اثر کشندگی عصاره بر سلول‌های سرطانی در دوزهای پایین‌تر یعنی ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پدیدار شد و میزان زنده مانی در این غلظت به ۸۰٪ رسید که از نظر آماری این

کشندگی معنادار بود اما همچنان اثر معناداری بر زنده مانی سلول‌های غیر سرطانی نداشت ($P<0.001$). پس از گذشت ۷۲ ساعت شاهد کشندگی بیشتر عصاره حتی بر سلول‌های نرمال در سطح معنادار $P<0.001$ بودیم. به طوری‌که میزان بقا به ٪۴۸ در سلول‌های سرطانی در بالاترین دوز (دوز ۱۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) رسید اما میزان بقاء همچنان در سلول‌ها طبیعی بالا و حدود ٪۸۱ در بالاترین دوز (دوز ۱۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود، و میزان مرگ را نتوانست به ٪۵۰ برساند. همچنین IC_{50} (غلظتی که در آن نیمی از سلول‌ها زنده باشند) دوز ۸۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۷۲ ساعت تیمار در سلول‌های سرطانی تعیین گردید ($P<0.001$). (تصویر ۲).

بحث

در عصر امروزی استفاده از سیر به عنوان یک عامل ضد سرطان از دهه ۱۹۵۰ آغاز گردید و مشخص گردید که عصاره‌های حاوی تیوسولفینات به‌دست آمده از سیر رشد سلول‌های توموری را مهار می‌کنند. چنین یافته‌هایی در کنار مطالعات اپیدمیولوژیک تایید کننده اثرات شیمی درمانی و ضدسرطانی سیر بود [۳]. مطالعات تجربی در زمینه سرطان‌زایی پیشنهاد کرده اند که اجزای موجود در سیر آغاز تومورزایی را در انواع مختلف سرطان از جمله کلورکتال، پوست و شش‌ها مهار می‌کند [۲۱]. همچنین در مطالعات قبلی گزارش شده است که پودر سیر در رژیم غذایی تومورهای پستانی را مهار می‌کند [۱۶] و عصاره سیر شیوع سرطان دهانه رحم را کاهش می‌دهد [۹].

ما در این مطالعه از عصاره آبی سیر به عنوان یک منبع بالقوه درمانی برای بررسی اثرات ضد سرطانی سیر بر روی سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7



تصویر ۲- بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی سیر بر میزان بقای سلول‌های سرطانی MCF-7 و سلول‌های فیبروبلاستی طبیعی موش L929 توسط آزمون MTT. الف- ۲۴ ساعت پس از تیمار، ب- ۴۸ ساعت پس از تیمار و ج- ۷۲ ساعت پس از تیمار. نتایج بصورت میانگین ± انحراف از معیار گزارش شده است. * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار میان میزان بقای سلول‌های سرطانی و طبیعی در سطح $p<0.001$ است.**

استفاده نمودیم. همچنین جهت مقایسه اثر سمیت عصاره بر سلول‌های نرمال از سلول‌های طبیعی فیبروبلاست موش رده L929 استفاده شد.

یافته‌های ما در این تحقیق پیشنهاد می کنند که مرگ سلول های سرطانی تیمار شده با عصاره آبی سیر بصورت وابسته به دوز و وابسته به زمان عمل می‌کند. بطوریکه دوزهای پایین در ۲٤ ساعت اثری بر کشندگی سلول‌های سرطانی نداشت و دوزهای بالاتر از ٤۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معناداری باعث القاء آپوپتوز در این سلول‌ها شد. همچنین در ٤۸ و ۷۲ ساعت به غیر از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که پایین ترین غلظت عصاره بود، بقیه غلظت‌ها باعث القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی MCF-7 شدند. این نتیجه بیانگر آن بود که با دادن زمان بیشتر به دوزهای پایین‌تر نیز می‌توان قدرت القاء آپوپتوز توسط سیر را بر سلول‌های سرطانی سینه مشاهده نمود. با این وجود بالاترین مرگ سلولی را در ۷۲ ساعت مشاهده نمودیم، به‌طوری‌که IC_{50} (غلظتی از عصاره که ۵۰٪ سلول‌ها زنده باشند) در ۷۲ ساعت و برای غلظت ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین در بازه زمانی ۲٤ و ٤۸ ساعت هیچ گونه مرگ معناداری در سلول‌های نرمال L929 که تحت تیمار با عصاره سیر قرار گرفته بودند مشاهده نگردید. طبق نتایج تنها در غلظت‌های ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالا در ۷۲ ساعت مرگ معنادار را در سلول‌های نرمال فیبروبلاستی مشاهده نمودیم ولی این میزان مرگ به ۵۰٪ هرگز نرسید. بنابراین می‌توان گفت که سیر بر خلاف سلول‌های سرطانی، اثر کشندگی بسیار کمی بر سلول‌های نرمال دارد.

در تحقیق حاج زاده و همکاران در سال ۱۳۸٤ اثر مهاری عصاره آبی سیر بر رشد سلول‌های سرطان حنجره نوع SCC (HEP-2) و سلول‌های غیر سرطانی L929 مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های mg/ml ۰/۵، ۱، ٤، ۸، ۱۰و ۱۲ از عصاره آبی سیر در محیط کشت، روی سلول‌ها اثر داده شد و پس از۲٤، ٤۸ و۷۲ ساعت، تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده با میکروسکوپ معکوس ارزیابی گردید. همچنین با آزمون MTT اثر این غلظت‌های عصاره بر درصد سلول‌های زنده هر دو رده سلولی در زمان‌های مذکور، از نظر کمی بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۸، ۱۰و ۱۲mg/ml عصاره، پس از ۲٤ ساعت موجب تغییرات مورفولوژیک در هر دو رده سلولی می‌شود و این تغییرات پس از ٤۸ و ۷۲ ساعت تشدید می‌گردد. هم زمان نتایج آزمون MTT نشان داد که همه غلظت‌های عصاره موجب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های زنده Hep-2 و L929 می‌گردد. بطوری‌که پس از ۷۲ ساعت کاهش درصد سلولی نسبت به سلول‌هایی که تحت تاثیر عصاره نبودند در سطح $P<0.001$ معنی‌دار بود که نتایج این تحقیق با پژوهش حاضر مطابقت دارد [۷].

چندین مکانیسم برای تفسیر اثرات ضد سرطانی سبزیجات تیره Allium و ترکیبات ارگانوسولفوره موجود در آنها شناخته شده است. این مکانیسم‌ها شامل مهار جهش از طریق مهار متابولیسم، مهار تشکیل تجمعات DNA، حذف رادیکال‌های آزاد، تاثیر بر تکثیر سلولی و رشد تومور می‌باشند. اگرچه شواهد زیادی برای تایید انجام این مکانیسم‌ها توسط ترکیبات ارگانوسولفوره سیر وجود دارد، با این وجود تحقیقات بیشتری برای یافتن ارتباط بین این مکانیسم‌ها با خاصیت ضدسرطانی این ترکیبات در حیوانات آزمایشگاهی لازم می‌باشد [۱۸].

اثرات بیولوژیکی سیر به ترکیبات ارگانوسولفوریک آن مانند آلیسین (دی آلیل تیوسولفات) مربوط می‌شود که جزء اصلی و فعال عصاره سیر تازه می‌باشد. این ماده بسیار ناپایدار است و تحت یک واکنش شیمیایی تبدیل به دی آلیل سولفید، دی آلیل دی سولفید، دی آلیل تری سولفید، آلیل متیل سولفید، دایتین و آجوئن می‌شود [۱]. آلیسین می‌تواند به‌راحتی به درون وزیکول‌ها یا سیتوپلاسم گلبول‌های قزمز خون انتشار یابد و دو لایه لیپیدی مانع نفوذ آلیسین و انتشار نمی‌شود [۱٤]. این ویزگی موجب می شود که آلیسین در سیستم های بیولوژیکی به سرعت به بخش‌های مختلف سلولی نفوذ کند و اثرات بیولوزیکی اش را اعمال کند. به این ترتیب، اهمیت آلیسین به عنوان یک ملکول زیستی موثر نه تنها واکنش‌پذیری بالایی با تیول‌هایی با وزن ملکولی بالا و پایین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فوق العاده‌ای دارد بلکه نفوذ بسیار بالایی در غشاهای زیستی دارد [۱۵]. آلیسین باعث مهار تکثیر سلول های سرطانی پستان، اندومتر رحمی و کلون می‌شود [۸]. یکی دیگر از مشتقات محلول درآب سیر، S–آلیل مرکاپتو سیستئین است که می‌تواند رشد سلولی را مهار کند و چرخه سلولی را در فاز M متوقف کند و باعث القاء آپوپتوز در رده سلول های HT29 شود [۱۷]. فعال شدن JNK1 و Caspase-3 و دپلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها نقش مهمی در آپوپتوز القاء شده توسط S– آلیل مرکاپتوسیستئین دارد [۲۱]. جلوگیری از تغییرات بدخیمی در نتیجه مهار کارسینوژن‌ها توسط تاثیر سیر روی آنزیم‌های سیتوکروم P450، فعالیت آنتی اکسیدانی و سم زدایی است. در واقع ترکیبات سولوفوری سیر این اعمال را انجام می‌دهند [۱].

در چندین پژوهش نشان داده شده است که ترکیبات سولفوری محلول در آب و محلول در چربی موجود در سیر فواید ضدسرطانی دارند [۳]. کاراساکی و همکارانش گزارش نمودند که بعد از تیمار سلول‌های لنفومای هیستوکیستیک (U937) با دوزهای مختلف لکتین سیر به مدت ۷۲ ساعت، نزدیک به ۳۰٪ سلول‌ها دچار آپوپتوز می شوند با نتایج این تحقیق قرابت دارد. آنها فرض کردند که لکتین با اتصال به غشاء سلول‌های سرطانی اثرات سمی خود را اعمال می‌کنند [۱۰]. مهار مستقیم رشد سلول‌های سرطانی در کشت بافت در سارکوما و همچنین در رده‌های سلول‌های سرطانی از قبیل سرطان معده، کلون، مثانه و پروستات اثبات شده است [۱].

نتیجه‌گیری

عصاره آبی سیر به صورت وابسته به دوز باعث القاء مرگ سلولی در رده سلول‌های سرطانی سینه کشت شده (MCF-7) می‌شود. ما دریافتیم که بالاترین مرگ سلولی ۷۲ ساعت پس از تیمار با عصاره آبی سیر حاصل می‌شود. همچنین این عصاره اثر سمیت بر سلول‌های نرمال فیبروبلاستی موش (L929) اما این کشندگی بسیار کم بود و پس از ۷۲ در بالاترین غلظت‌ها (۱۲۰۰۰ و ۸۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ۱۹٪ مرگ را در این سلول‌ها به دنبال داشت. در حالیکه IC_{50} برای سلول‌های سرطانی در غلظت ۸۰۰۰ میکروگرم بود.

در مجموع چنین به نظر می‌رسد که استفاده از دوزها و مدت زمان مصرف سیر می‌تواند روی سلول‌های سرطانی اثر سمی داشته باشد و این اثرات بر سلول‌های سالم بسیار کمتر خواهد بود و می‌توان با تحقیقات بیشتر و دقیق‌تر از سیر و ترکیبات سولفوره محلول در آب موجود در سیر به عنوان یک مکمل در

شیمی درمانی جهت حذف انتخابی سلول‌های سرطانی در آینده استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بدین وسیله از همکاران محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل به سبب مساعدت و همکاری در انجام این پژوهش تشکر صمیمانه دارند.

References:

[1] Balasenthil S, Rao KS, Nagini S. 2002. Altered cytokeratin expression during chemoprevention of experimental hamster buccal pouch carcinogenesis by garlic. J Oral Pathol Med; 31(3): 142-6.

[2] Colic M, Vucevic D. 2002. Kilibarda V, Radicevic N and Savic M. Modulatory effects of garlic extracts on proliferation of T-lymphocytes in vitro stimulated with concanavalin A. phytomed; 9: 117-125.

[3] Corzo-Martinez M, Corzo N, Villamiel M. 2007. Biological properties of onions and garlic. Trends Food Sci Technol; 18(12): 609-625.

[4] El-Sabban F. 2009. Garlic as an antithrombotic and antiplatelet aggregation agent. East Mediter Health J; 4(5): 288-294.

[5] Farooq S, Coleman MP. 2005. Breast cancer survival in South Asian women in England and Wales. J Epidemiol Community Health; 59(5): 402-406.

[6] Fisch T, Pury P, Probst N, Bordoni A., Bouchardy C, Frick H, Jundt G, De Weck D, Perret E, Lutz JM. 2005. Variation in survival after diagnosis of breast cancer in Switzerland. Ann Oncol; 16(12): 1882-1888.

[7] [7] Hajzadeh M, Afshari J, Ghorbani A, Shakeri, M. 2006. The effects of aqueous extract of Garlic (Allium sativum L.) on larynegeal cancer cells (Hep-2) and L929 cells in vitro. JMP; 2(18): 41-48.

[8] Hirsch K, Danilenko M, Giat J, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Mirelman D, Levy J, Sharoni Y. 2000. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. Nutr Cancer; 38(2): 245-54.

[9] Hussain SP, Jannu LN, Rao AR. 1990. Chemopreventive action of garlic on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix of mice. Cancer Lett; 49(2): 175 -80.

[10] Karasaki Y, Tsukamoto S, Mizusaki K, Sugiura T, Gotoh S. 2001. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. Food Res Int; 34(1): 7-13.

[11] Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic. J Chromatogr A; 1112(1-2): 3-22.

[12] Levenson AS, Jordan VC. 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. Cancer Res; 57(15): 3071-3078.

[13] Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X. 2010. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come. Chemoprevention by natural products: how far have we come. Pharmaceutical Research, 27(6): 950-961.

[14] Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M, Weiner L. 2000. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. Biochim Biophys Acta; 1463(1): 20-30.

[15] Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. 1998. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. Biochim Biophys Acta; 1379(2): 233-44.

[16] Schaffer EM, Liu JZ, Green J, Dangler CA, Milner JA. 1996. Garlic and associated allyl sulfur components inhibit N-methyl-N-nitrosourea induced rat mammary carcinogenesis. Cancer Lett; 102(1-2): 199-204.

[17] Shirin H, Pinto JT, Kawabata Y, Soh JW, Delohery T, Moss SF, Murty V, Rivlin RS, Holt PR, Weinstein IB. 2001. Antiproliferative effects of S-allylmercaptocysteine on colon cancer cells when tested alone or in combination with sulindac sulfide. Cancer Res; 61(2): 725-31.

[18] Shukla Y, Kalra N. 2007. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. Cancer Lett; 247(2): 167-81.

[19] Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK. 2001. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. Current Science; 80(11): 1387-1396.

[20] Tripathi K. 2009. A review–garlic, the spice of life-(Part –I). Asian J Res Chem; 2(1): 8-13.

[21] Xiao D, Pinto JT, Soh JW, Deguchi A, Gundersen GG, Palazzo AF, oon JT, Shirin H, Weinstein IB. 2003, Induction of apoptosis by the garlic derived compound S-allylmercaptocysteine (SAMC) is associated with microtubule depolymerization and c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 activation. Cancer Res; 63(20): 6825-37.

Effect of aquatic garlic (*Allium sativum* L.) extract on the survival of breast cancer cells (MCF-7) and non-cancerous cells of mouse fibroblasts (L929)

Hassanzadeh Z.[1], Mikaeili Agah E.[1*], Asadi A[2], Bagherivalami K[3].

[1] Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[3] Department of Internal Medicine, School of Medicine, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran

[*] Email: e.mikaeili@gmail.com

Received: 5 October 2018 Accepted: 2 February 2019

Abstract
Garlic has been known worldwide as a dietary constituent with many pharmacological effects in humans for centuries. The aim of this study was to compare the cytotoxicity effect of the aqueous extract of garlic on breast cancer cells (MCF-7) and non-cancerous normal cells (L929). After culture and treatment of cells with different concentrations of extract for 24, 48 and 72 hours, the cell morphology was investigated by invert microscopy and the toxic effect of the extract was determined by MTT (3- 4, 5 dimethylthiazole 2-yl 5,2-diphenyl tetrazolium). Microscopic observations showed no change in both cell lines within 24 hours. These changes appeared after 48 and 72 hours in cancerous cells and increased after 72 hours, but no significant changes were observed in healthy cells. At the same time, the results of MTT showed that the mortality rate was significant at high doses at 24 and 48 hours ($P < 0.001$), and in 72 hours it was very intense and survival rate reached 48% at the highest dose. However, at 24 and 48 hours, we did not see significant death in non-cancerous cells, but at higher doses of 4000 μg/ml in 72 hours, death increased significantly ($P < 0.001$) but did not exceed 19%. Therefore, aqueous extract of garlic has a greater effect on breast cancer cells than normal cells, and can be used to prevent cancer or as a supplement to chemotherapy in the future.

Keywords: Breast Cancer Cell, Mouse Fibroblast Cell, Aqueous Extract of Garlic, Cytotoxicity.