

بررسی امکان پیشگیری از القاء سرطان پستان در رت توسط NMU، با تجویز کروسین یا کروسیتین

میثم سجادی *

چکیده

یکی از علل مرگ و میر زنان در دنیا سرطان پستان می باشد. در تحقیقات مختلفی که انجام شده است نشان داده شده که رژیم غذایی یکی از تاثیر گذارترین علل ابتلا به سرطان پستان می باشد. رژیم غذایی و سرطان پستان با هم مرتبط هستند به طوری که رژیم غذایی با چربی و پروتئین بالا، و فیبر و کربوهیدرات کم خطر ابتلا به سرطان سینه را افزایش می دهد. در تحقیق حاضر ابتدا دو کاروتنوئید کروسین و کروسیتین از زعفران جدا شده و سپس اثر پیشگیری آن در القای تومور های پستانی در رت مورد مطالعه قرار داده شد. القای سرطان توسط کارسینوژنی بنام NMU انجام شد. مراحل القای سرطان شامل مرحله آغازین، مرحله پیشرفت و مرحله بدخیمی می باشد. در این مطالعه پیشگیری از سرطان پستان القا شده در موش صحرائی (رت) در دو مرحله آغازین و مرحله پیشرفت انجام شد و سپس رت ها کشته شده و بافت های مغز، قلب، تخمدان، کبد، طحال و تومور آنها جدا شد. بافت ها وزن شد که از لحاظ وزن بافت ها تغییر چشمگیری مشاهده نشد، سپس فعالیت آنزیم EDA (آنزیم آمینوپپتیداز تجزیه کننده انکفالین) اندازه گیری شد که فعالیت این آنزیم نیز تغییر معناداری در گروه های مختلف پیشگیری شده نداشت. اما دوره کمون یا زمان بروز تومور و میزان بروز تومور در گروه های پیشگیری شده با کروسین و کروسیتین تغییرات قابل ملاحظه ای داشت

واژه های کلیدی سرطان پستان، رت، آنزیم، برادفورد، دوره کمون

* ماستر بیوشیمی کلینیکی و سرپرست دانشکده تکنولوژی پوهنتون خاتم النبیین (ص)

کاروتنوئیدها رنگدانه‌هایی در میوه‌ها و نباتاتی هستند که باعث ایجاد رنگ‌های زرد، نارنجی و سرخ می‌شوند. بتا کاروتن، لیکوپن، لوتئین و همه انواع مختلف کاروتنوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی با خواص ضدسرطان شناخته شده‌اند. نتایج مطالعاتی که در کشور چین بر روی زنان انجام شده است حاکی از این است که مصرف انواع کاروتنوئیدها مانند لیکوپن، α -کاروتن، β -کاروتن، β -کرپتوکسانتین و لوتئین خطر ابتلا به سرطان سینه را کاهش داده است. کاروتنوئیدها همچنین علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی ممکن است خواص ضد جهش‌زایی و ضدسرطانی هم داشته باشند. همچنین محققان چینی به این نتیجه رسیدند که مصرف دزهای بالاتر از کاروتنوئیدها اثرات بهتری را در پیشگیری از سرطان پستان دارد {Huang, 2007 #25}.

زعفران یا از قدیم‌الایام در قسمت‌های مختلف جهان استفاده‌های غذایی و دارویی داشته است، که در ایران به خاطر قیمت بالای آن طلای سرخ نامگذاری شده است. ترکیبات شیمیایی زعفران در دو دهه اخیر توجه زیادی به خود جلب کرده است. تقریباً ۱۵۰ ترکیب فرار و غیر فرار برای زعفران تخمین زده شده است، که از این میان ۴۰-۵۰ ترکیب آن شناخته شده است. اطلاعات به دست آمده نشان می‌دهد که کلاله سرخ زعفران دارای سه متابولیت اصلی است. ۱- کروسین‌ها: که ترکیبات رنگی زعفران هستند (کاروتنوئیدهای محلول در آب ناشی از حجم بالای گلیکوزیل‌های آن است). ۲- پیکرو کروسین‌ها: که ماده اصلی مسئول طعم تلخ زعفران است. ۳- سافرانال: یک روغن فرار است که باعث بوی زعفران است. علاوه بر اینها آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها (مخصوصاً ریوفلاوین و تیامین)، آمینو اسیدها، پروتئین‌ها، نشاسته، مواد معدنی (N, Fe, Na, K, Cu, Mn)، صمغ و دیگر ترکیبات شیمیایی در زعفران پیدا شده است {Bathaie, #17; Bhat, 1953 #41}.

کروسین یکی از اجزاء اساسی تشکیل‌دهنده زعفران و در حقیقت منبع غنی رنگ آن و یکی از محدود کاروتنوئیدهای محلول در آب موجود در طبیعت است. کروسین گلیکوزیل استرهای از پلی‌ان‌دی‌کربوسیلک اسید کروسین هستند. این گلیکوزیل استرها دارای

کربوهیدرات‌های سیکلیک، *D*-گلوکز و *D*-جنتوبیوزید هستند که این کربوهیدرات‌ها به واسطه هیدروکسیل آنومری خود با گروه کربوکسیلیک اسید در دو انتهای کروسیتین استریفیه شده‌اند و بر خلاف گلیکوزیدها که پایدارند، گلیکوزیل استرها به آسانی در شرایط اسید و بازی هیدرولیز می‌شوند.

کروسیتین حاصل تجزیه گلیکوزید کروسین است و همراه با کروسین عمدتاً مسئول رنگ سرخ زعفران هستند. کروسیتین در آب و اکثر حلال‌های آلی به استثنای پیریدین و دی‌متیل سولفوکساید (*DMSO*) و سود رقیق نامحلول است. جذب آن در طول موج‌های ۴۳۴/۵ و ۴۶۳ نانومتر است. نقطه ذوب دی‌متیل کروسیتین ۲۲۲/۵ درجه سانتیگراد است. به دلیل کم بودن میزان دی‌متیل کروسیتین در کلاله زعفران، بیشتر این ماده از طریق هیدرولیز قلیایی کروسین و متیله شدن توسط دی‌کلرومتان انجام می‌گیرد. نقاط ماکزیمم جذب آن در دی‌کلرومتان در طول موج‌های ۴۳۱ و ۴۵۸ نانومتر است.

در سال ۱۹۶۱ *Huggins* و همکارانش روش مناسبی را برای القای سرطان پستان در رت‌های ماده پیشنهاد کردند. در این روش از یک تک دز ماده سرطان‌زای شیمیایی استفاده می‌شد. *Huggins* ۳ کارسینوژن شیمیایی را گزارش کرد، از بین آنها *DMBA* (7,12 *Dimethylbenz(α)anthracene* بیشترین ویژگی و قوی‌ترین سرطان‌زایی را برای القای سرطان سینه نشان داد. از آن هنگام به بعد استفاده از این روش برای مطالعه تمایز میان مراحل سرطان‌زایی شروع، ترویج و پیشرفت توسط محققین دیگر بسیار مرسوم شد. اما امروزه *NMU* کارایی بیشتری را در بروز تومور و میزان بالای کارسینوما پستانی را نشان داده است که معمولاً در یک تک دز یا چند دز مختلف به صورت داخل صفاقی یا داخل وریدی تجویز می‌شود. هر دو روش (*NMU* و *DMBA*) برای القای سرطان پستان در رت و بررسی مراحل شروع، ترویج و پیشرفت قابل استفاده می‌باشد { *HIROSHI*; 1994 #33; *Anzano*, 2002 #34 *INANO* }. شکل ۱-۳ مراحل القای سرطان در یک سلول را پس از تجویز ماده سرطان‌زا نشان می‌دهد. در این شکل مراحل شروع، ترویج و پیشرفت سرطان به طور شماتیک نشان داده شده است.

هر یک از این سرطان‌زاهای شیمیایی نقاط ضعف و قوت مخصوص به خود را دارا می‌باشد که در تحقیق حاضر از NMU (شکل ۱-۳ جهت القاء سرطان پستان در موش‌های صحرایی ماده و یستار استفاده شد که به برخی دلایل و نقاط قوت آن در این بخش اشاره می‌شود. همچنین مون و همکارانش در سال ۲۰۱۰ مطالعه‌ای را انجام دادند که در آن اثر دو کارسینوژن NMU و NEU را بر فعالیت NF- κ B بررسی کردند و دریافتند که احتمالاً NMU و NEU باعث افزایش فعالیت NF- κ B می‌شوند. در این آزمایش نتیجه گرفتند که افزایش فعالیت سلولی NF- κ B در سلول‌های کراتینوسیت‌های انسانی از طریق مسیر پروتئین کیناز c اتفاق می‌افتد. و این یافته این فرضیه را که القای بیان NF- κ B ممکن است در القای سرطان‌زایی شیمیایی از طریق NMU و NEU نقش مهمی داشته باشد، تایید می‌کند { Moon, #12}.

همچنین مطالعات نشان داده است در رت‌هایی که توسط NMU القای تومور صورت گرفته است فعالیت آنزیم پیرولیدون کربوکسی پتیداز سرمی به طرز معناداری کاهش یافته است و در نتیجه غلظت GnRH افزایش یافته و در پیروی از آن ترشح هورمون‌های جنسی استروژن و پروژسترون و همچنین غلظت انکفالین افزایش یافته و زمینه برای رشد، پیشرفت و بدخیمی تومورهای پستانی مساعد می‌شود {Dr. Jose Manuel Martinez-Martos, 2010 #62}.

روش کار

۷۲ عدد موش صحرایی و یستار آلبینو ۳۴-۳۶ روزه از حیوان‌خانه پوهنتون تربیت مدرس خریداری شده و هر ۵-۴ موش صحرایی در یک قفس در حیوان‌خانه پوهنتون تربیت مدرس نگهداری شد. ساعت روشنایی از ۶ بامداد الی ۲۰ و دمای نگهداری 25°C بوده و حیوانات از لحاظ دسترسی به آب و غذا آزاد بودند.

پس از خریداری موش‌های صحرایی و یستار، ۱۲ روز جهت تطبیق با شرایط جدید نگهداری و رسیدن به سن مورد نظر در حیوان‌خانه، به موش‌های صحرایی زمان داده شد. تمامی مراحل نگهداری در حیوان‌خانه پوهنتون تربیت مدرس صورت گرفت. کلیه آزمایشات و نحوه برخورد با موش‌های صحرایی منطبق با قانون اخلاق طبی مصوب پوهنتون

تربیت مدرس انجام شد.

رت‌ها هر هفته توزین شدند و هر هفته برای یافتن تومورهای پستانی مورد ملامسه قرار گرفتند و در صورت بروز تومور سائز آن اندازه گیری شد. همچنین دوره کمون هر تومور و میانگین آن برای هر گروه اندازه گیری شد و نمودار آن توسط نرم افزار *excel* رسم شد. در هفته چهارم بعد از اولین تزریق موش‌های صحرایی، جهت شناسایی ظهور تومور مورد معاینه قرار گرفتند. اندازه تومور، فاز تاخیری ظهور تومور و میانگین تعداد تومور به ازاء هر موش صحرایی نیز مورد بررسی قرار گرفت. اندازه گیری تومور به وسیله کولیس انجام شد که دو قطر محوری بزرگ ($R1$) و قطر محوری کوچک ($R2$) مورد اندازه گیری قرار گرفت و سائز تومور به وسیله فرمول زیر بدست آمد {حمیدحیدرزاده، سنبله ۱۳۸۹ #۳۰}.

$$T.V = \frac{4}{3} \pi (R1)^2 (R2)$$

فرمول ۲-۲. فرمول اندازه گیری حجم تومور

رت‌های موجود در این گروه‌ها تا هفته بیست و چهارم زنده بودند و در این هفته توسط کتامین و زایلوزین از طریق تزریق داخل صفاقی بیهوش شده و سپس بافت‌هایی از قبیل مغز، تخمدان، رحم، قلب، کبد، کلیه و طحال برداشته شد و در فریزر ۸۰- نگه داری شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم EDA

به منظور سنجش آنزیم EDA، ابتدا بافت‌های مغز و تخمدان دفریز شد. در ادامه بافت‌ها، جهت تهیه نمونه بافتی محلول، در بافر تریس اسید کلریدریک ۱۰ میلی مولار (10 mM) *Hcl - Tris* با $pH 7.4$ و با نسبت ۱۰ به ۱ بافر به حجم نمونه، به وسیله هموژنایزر هموژن شد. سپس به مدت ۵۵ دقیقه (g) ۳۰/۰۰۰ سانتی‌فیوژ هموژن‌ها صورت گرفت. سپس سوپ روئی موجود جدا سازی شد و فعالیت آنزیمی و محتوای پروتئینی به صورت دو تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. برای سنجش محتوای پروتئینی موجود در محلول رویی همان‌طور که گفته شد از روش برادفورد و آلومین سرم گاو (*BSA*) به عنوان استاندارد استفاده شد. فعالیت ویژه آنزیمی EDA بوسیله روش فلورمتری با استفاده از تایروزین - بتا - نفتیل آمید (*TyrNNap*) به عنوان سوبسترا و بتا نفتیل آمین به عنوان محصول و تهیه استاندارد مورد

استفاده قرار گرفت. به این منظور، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به صورت دو تکرار، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا که حاوی تایروزین- بتا - نفتیل آمید ۱۰۰ میکرومولار و دی تیوتریتول ۰/۶۵ میکرومولار در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۴ بود، قرار گرفت. سپس تمام واکنش‌ها با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر استات ۰/۱ مولار با pH ۴/۲ متوقف گردید. میزان بتا نفتیل آمین آزاد شده در اثر فعالیت آنزیمی با روش فلورمتری در طول موج نشی ۴۱۲ با برانگیختگی nm ۳۴۵ مورد اندازه گیری قرار گرفت {Carrera Mdel, 2005 #27}.

فعالیت ویژه EDA بر حسب نانومولار تایروزین- بتا - نفتیل آمید هیدرولیز شده در دقیقه به ازاء هر میلی گرم پروتئین با استفاده از نمودار استاندارد بتا نفتیل آمین محاسبه گردید. اندازه گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد در این روش از آلبومین سرم گاوی برای تهیه نمودار استاندارد استفاده شد. حال با داشتن غلظت پروتئین (بدست آمده با تست برادفورد) و غلظت بتا نفتیل آمین ناشی از فعالیت EDA بر مبنای نمودار استاندارد غلظت بتا نفتیل آمین (بدست آمده با نشر فلورسانس) طبق فرمول ۲-۳ فعالیت ویژه آنزیم EDA اندازه گیری شد.

$$\text{فعالیت ویژه آنزیم EDA} = \frac{\text{غلظت بتا نفتیل آمین (بدست آمده با نشر فلورسانس)}}{\text{غلظت پروتئین تام (بدست آمده با برادفورد)}} \times 30 \text{ min}$$

فرمول ۲-۳. فرمول محاسبه فعالیت ویژه آنزیم EDA

تست برادفورد (Bradford test)

برای اندازه گیری میزان پروتئین در مایعات بیولوژیک، روش‌های متعددی وجود دارد. جهت اندازه گیری میزان پروتئین تام موجود در عصاره سلولی بافت هموژن شده، از روش برادفورد استفاده گردید. در این روش رنگ کوماسی برلیانت بلو G250 در محیط اسیدی با پروتئین ایجاد کمپلکس رنگی کرده که جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر ارزیابی شد.

مواد و وسایل لازم در این روش عبارتند از اسپکتروفومتر *UV-Visible*، محلول استاندارد پروتئین، حاوی ۱ میلی گرم آلبومین سرم گاوی در یک میلی لیتر معرف رنگی، شامل ۱۰۰ میلی گرم رنگ کماسی برلیانت بلو *G250* که در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ حل شد، سپس به آن ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ اضافه شد. حجم محلول به وسیله آب مقطر به یک لیتر رسانده شد و معرف رنگی ساخته شده به وسیله کاغذ صافی، فیلتر گردید.

تهیه محلول استاندارد و بدست آوردن غلظت نمونه‌های مجهول، مطابق جدول (۲-۴) انجام شد. محتویات هر لوله مخلوط شده و در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها و استانداردها در مقابل شاهد در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. تمام آزمایش‌ها به صورت ۲ تکرار انجام گردید. با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در نمونه‌ها بدست آمد. در مورد نمونه‌هایی که غلظت آن‌ها خارج از محدوده منحنی استاندارد بوده رقت مناسب تهیه شد و آزمایش تکرار گردید.

جدول ۲-۴. مقادیر اضافه شده (میکرو لیتر) برای تعیین میزان پروتئین نمونه‌های مجهول

لوله‌ها	شاهد	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	مجموع هو ل
استاندارد (میکرو لیتر)	-	۵	۱	۱	۲	۲	۳	۳	۴	۴	-
بافر (میکرو لیتر)	۵	۴	۴	۳	۳	۲	۲	۱	۱	۵	۴۰
نمونه (میکرو لیتر)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۰

تهیه اسلاید پاتولوژی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین

تمامی بافت‌ها به ترتیب در ده برابر حجم خود هر کدام به مدت یک ساعت در محلول‌های زیر نگهداری شدند. این مراحل جهت آبگیری از بافت انجام گرفت.

الکل ۷۰٪ به مدت ۱ ساعت

الکل ۸۰٪ به مدت ۱ ساعت

الکل ۹۰٪ به مدت ۱ ساعت

الکل ۱۰۰٪ به مدت ۱ ساعت

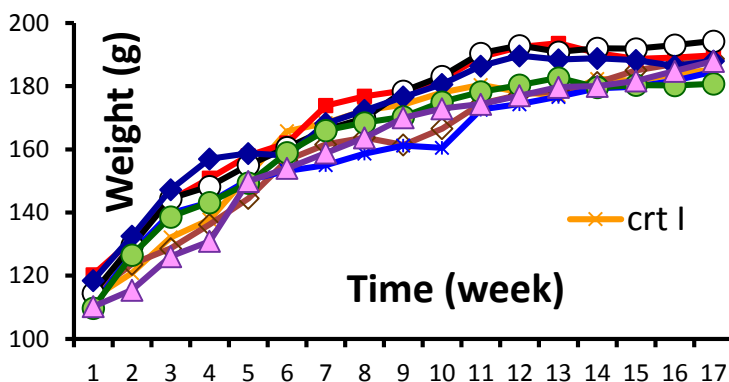
زایلول (دو بار) به مدت ۱ ساعت

بعد از مراحل آماده سازی و آبگیری از بافت ها، به وسیله پارافین مایع با دمای ۴۵ درجه، قالب گیری انجام شد و یک روز در دمای اتاق نگهداری شد تا قالب ها به صورت یکنواخت خنک شوند. سپس به وسیله میکروتوم، مقطع های ۵ میکرومتری از آن ها تهیه شد و بر روی لام ثابت شدند. جهت رنگ آمیزی، بعد از حرارت دادن لام و ذوب کردن پارافین، مراحل بالا به صورت برعکس جهت آبدهی تکرار شد. با این تفاوت که این بار، این مراحل هر یک به مدت ۳-۵ دقیقه انجام گرفت. در ادامه لام های آبدهی شده به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در هماتوکسیلین قرار گرفت. بعد از رنگ آمیزی لام ها با آب شسته شدند تا رنگ اضافه از بین رفت. سپس لام ها در محلول اتوزین به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. بعد از رنگ آمیزی با اتوزین، دوباره مراحل آبگیری از الکل ۷۰٪ تا زایلول هریک به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از اتمام کار رنگ آمیزی، نمونه ها بوسیله لامل پاتولوژی و چسب مخصوص تثبیت شدند.

آنالیز آماری

برای محاسبات آماری از نرم افزار SPSS 16 استفاده شد. مقایسه آماری از نوع مقایسه چند گروه مستقل با یکدیگر بود. روش های موجود برای مقایسه آماری به شرح زیر است. روش *One way Anova*: این روش پارامتریک است که شرط اول برای استفاده از این روش نرمال بودن داده ها می باشد. برای تعیین نرمال بودن داده ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. در صورتی که داده ها نرمال نبود، برای مقایسه چند گروه مستقل، از روش *Kruskal-wallis* استفاده شد که در این روش اگر $P < 0.05$ باشد نشان دهنده این است که حداقل یک گروه با بقیه اختلاف معنی داری دارد. برای فهمیدن این مطلب که کدام گروه اختلاف معنی دار دارد برای روش غیر پارامتریک متاسفانه در نرم افزار SPSS عملیاتی پیش بینی نشده است. به همین خاطر برای مشخص شدن این گروه باید از روش غیر پارامتریک مقایسه

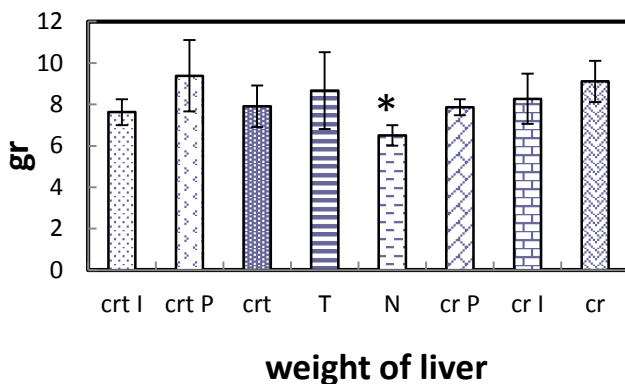
دو گروه مستقل *Mann Whitney* استفاده شد، به این صورت که تمامی گروه‌ها را دو به دو با هم مقایسه کردیم تا مشخص شود کدام گروه با بقیه اختلاف معنی داری دارد. بررسی وزن رت‌ها در طی دوره در گروه‌های توموری، پیشگیری و کنترل نتایج حاصل از بررسی وزن رت‌ها در طی دوره، در نمودار ۳-۱ آمده است همان طور که مشاهده می‌شود، در طی دوره تفاوت معنی داری از لحاظ وزنی در بین گروه‌ها مشاهده نشد. ($p > 0.05$) تمامی گروه‌ها از لحاظ وزنی از یک روند پیروی کردند.



نمودار ۳-۱: تغییرات وزن رت‌ها در طول دوره. حروف اختصاری به این شرح می‌باشد:
cr I: کروسین - *cr P initiation*: کروسین - *cr promotion*: کروسین.
crt I: کروسین - *crt P initiation*: کروسین - *T promotion*: توموری، *control* = کنترل

بررسی تفاوت وزن در کبد

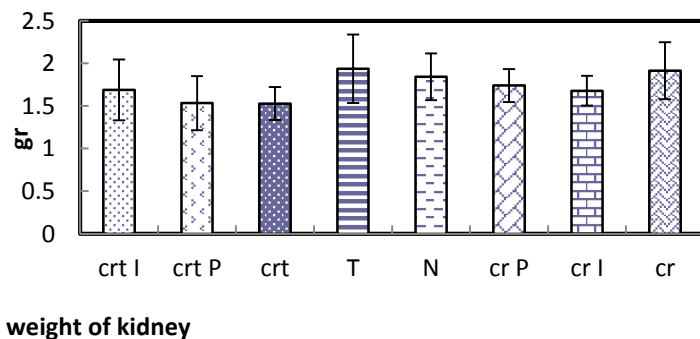
پس از کشتن رت‌ها و توزین کبدهای همه گروه‌ها، همان طور که در نمودار ۳-۲ نشان داده شده است همه گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل دارای افزایش وزن هستند و تغییرات معنادار $p = 0.025 < 0.05$ در وزن کبد بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها مشاهده شد.



نمودار ۳-۲: نمودار تفاوت وزن در بافت کبد. حروف اختصار استفاده شده، همانند شکل ۱

بررسی وزن بافت کلیه

همان طور که در نمودار ۳-۳ مشاهده می شود در وزن بافت کلیه ها در تمام گروه ها هیچ تفاوت معنی داری مشاهده نشد. با اینکه در گروه هایی که کروسیتین دریافت کرده بودند اندکی کاهش وزن دیده شد ولیکن این تفاوت وزن با $p = 0.48 > 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار نبود.

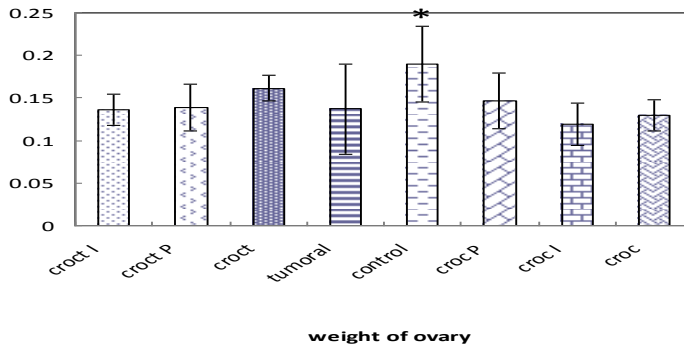


نمودار ۳-۳: تفاوت وزن در بافت کلیه

بررسی وزن بافت تخمدان

پس از کشتن رت ها بافت تخمدان از بافت رحم با دقت جدا شد و حتی الامکان سعی شد بافت چربی اطراف تخمدان جدا شود و سپس توزین گردید، همان گونه که در نمودار ۳-۴ مشاهده می شود تمامی گروه ها در مقایسه با گروه شاهد دارای کاهش وزن در تخمدان

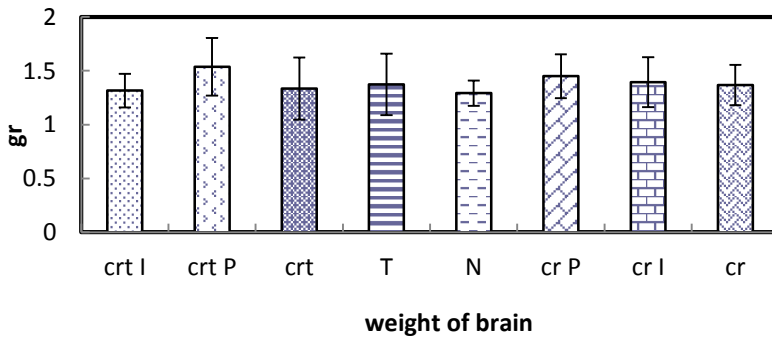
می باشند این تفاوت وزن گروه شاهد با گروه ترویج که با کروسین پیشگیری شده بود و گروهی که کروسین دریافت کرده بود ولی القای سرطان صورت نگرفته بود معنادار نبود. ولی تفاوت وزن در تخمدان گروه شاهد با بقیه گروه‌ها معنی دار ($p=0.044 < 0.05$) بود.



نمودار ۳-۴: بررسی وزن بافت تخمدان

بررسی وزن بافت مغز

در بافت مغز همان طور که در نمودار ۳-۵ مشاهده می شود هیچ تفاوت معناداری بین وزن این بافت در بین گروه های مختلف دیده نشد. ($p=0.734$)



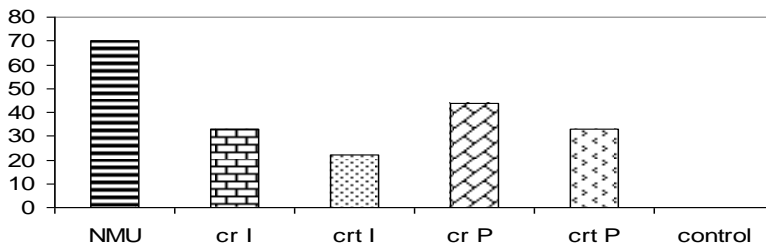
نمودار ۳-۵: بررسی وزن بافت مغز

بررسی تعداد تومور به ازای هر گروه در گروه های توموری در پایان دوره نتایج حاصل از تعداد تومور به ازای هر گروه در پایان دوره در جدول ۳-۶ آمده است. نتایج حاکی از آن بود که بالاترین تعداد تومور به ازای هر گروه در گروه توموری بدون

پیشگیری مشاهده شد. تعداد تومور به ازای هر گروه در گروه های پیشگیری، در گروه پیشگیری با کروسیتین از مرحله شروع از همه کمتر بود. همچنین در نمودار ۳-۷ درصد بروز تومور به شکل نمودار آمده است.

جدول ۳-۶: تعداد تومور در هر گروه و در صد بروز تومور نسبت به هر گروه

شاه د	توم ور	Crocini (initiat ion)	Crocini (promoti on)	Crocetin (initiat ion)	Croceti n (promot ion)	گروه ها
۹/	۱۰)	۳/۹)	۴/۹)	۲/۹)	۳/۹)	تعداد تومور
۰)	۷/					نسبت به هر گروه
٪۰	۷۰ ٪	٪۳۳	٪۴۴	٪۲۲	٪۳۳	در صد تومور نسبت به هر گروه

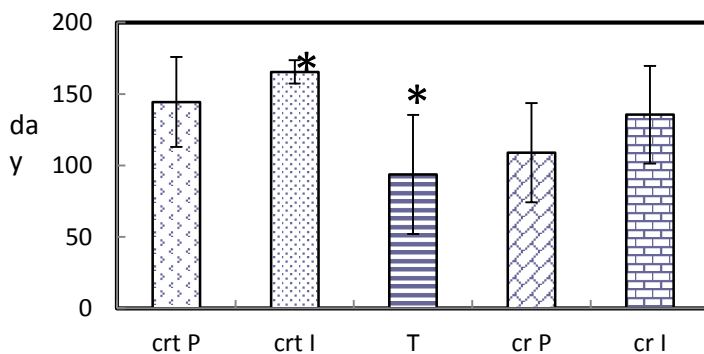


نمودار ۳-۷: نمودار درصد بروز تومور در هر گروه

بررسی و مقایسه دوره کمون در گروه های پیشگیری و توموری

دوره کمون به مدت زمانی گفته می شود که تومور ظاهر و قابل لمس می شود که از زمان تزریق اولین دز کارسینوژن تا ظاهر شدن تومور را می گویند. همان طور که در نمودار ۳-۸ مشاهده می شود دوره کمون در تمامی گروه های پیشگیری افزایش یافته است این افزایش در گروه هایی که از مرحله شروع تحت پیشگیری قرار گرفتند بیشتر از گروه هایی بود که از مرحله ترویج تحت پیشگیری قرار گرفتند. همچنین در گروه های تحت پیشگیری با

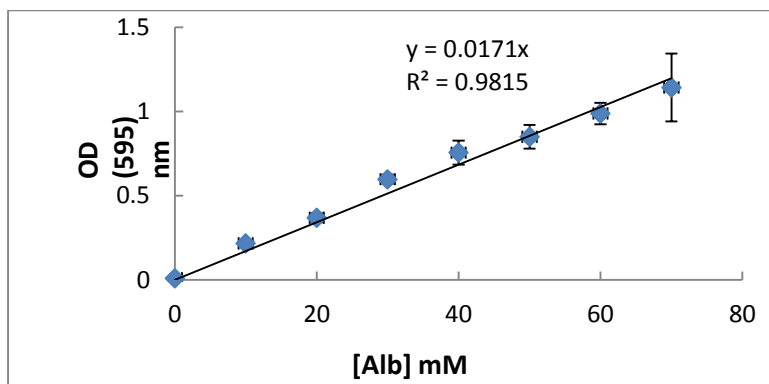
کروستین دوره کمون افزایش بیشتری نسبت به گروه های تحت پیشگیری با کروستین داشت. دوره کمون در گروه توموری بدون پیشگیری تفاوت معناداری با گروه های پیشگیری داشت. ($p=0.01 < 0.05$)



نمودار ۳-۸: مقایسه *latency period* در گروه های پیشگیری و توموری

منحنی استاندارد برادفورد

بر حسب مقادیری که در جدول ۲-۴ آمده است منحنی استاندارد برای تست برادفورد تهیه شد که در نمودار ۳-۹ مشاهده می شود.



نمودار ۳-۹. منحنی استاندارد تست برادفورد

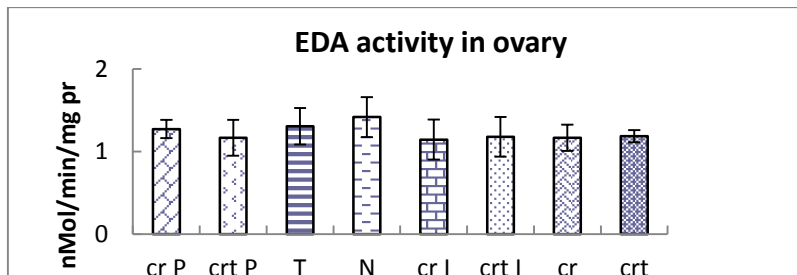
فعالیت آنزیم EDA در بافت مغز

همان طور که در نمودار ۳-۱۰ آمده است در بافت مغز گروه توموری بدون پیشگیری در

مقایسه با گروه رت های نرمال از لحاظ آماری افزایش معنا دار فعالیت این آنزیم را داریم. $(p=0.008 < 0.05)$ و در گروه های مورد پیشگیری شروع و ترویج فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه بدون پیشگیری کاهش داشت ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی دار نبود، لازم به ذکر است که در گروه های پیشگیری شروع کروسین و کروسیتین فعالیت EDA کاهش بیشتری داشت و نزدیک تر به گروه سالم بود.

فعالیت آنزیم EDA در تخمدان

همان طور که در نمودار ۳-۱۱ مشاهده می شود فعالیت این آنزیم در گروه های توموری و همچنین در گروه های تحت پیشگیری نسبت به گروه رت های سالم کاهش داشته است ولی این کاهش از لحاظ آماری معنا دار نبود. $(p=0.151 > 0.05)$



نمودار ۳-۱۱: فعالیت آنزیم EDA در تخمدان

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو کروسین و کروسیتین دارای خاصیت پیشگیری کنندگی در القای تومورهای پستانی توسط NMU می باشد به طوری که درصد بروز تومور در تمام گروه های پیشگیری نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش معنی داری داشت. همچنین در مقایسه گروه های پیشگیری با یکدیگر مشاهده شد که گروه های پیشگیری در مرحله شروع از نظر درصد بروز تومور نسبت به گروه های پیشگیری در مرحله شروع دارای نتایج بهتری بود و بروز تومور نیز کمتر بود. این نشان دهنده این موضوع است که کروسین و کروسیتین علاوه بر اثر پیشگیری کنندگی در مرحله ترویج دارای اثر پیشگیری از القای تومورهای پستانی در مرحله شروع هم بودند. همچنین در مقایسه اثر پیشگیری کنندگی از القای

تومورهای پستانی بین کروسین و کروسین از نظر درصد بروز تومور در هر گروه طبق نتایج به دست آمده (جدول ۳-۶) این طور استنباط می شود که در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، کروسین دارای اثر پیشگیری کنندگی بیشتری نسبت به کروسین بود. نتایج مطالعات قبلی نیز با داده های ما هماهنگ است. به طوری که در سال ۲۰۰۹ *Animesh Dhar* و همکارانش در مطالعه ای اثرات درمانی کروسین را بر سرطان پانکراس در موش و هم *in vitro* بررسی کردند و کاهش معنی داری را در رشد تومور مشاهده کردند و همچنین افزایش بیان *bax/bcl2* و کاهش بیان *EGFR* و *cyclin B* و القای آپوپتوز را در هر دو آزمایش *in vitro* و *in vivo* مشاهده کردند و نتیجه گرفتند که کروسین تقسیم سلولی را در فاز S مهار می کند. همچنین کروسین باعث هایپرفسفوریله شدن پروتئین *cdc2* می شود که باعث غیر فعال شدن خاصیت کینازی آن شده و سلول از فاز G2 وارد فاز میتوز نمی شود { *Dhar, 2009 #28*}. در سال ۲۰۰۵ نیز *Magesh* و همکارانش در مطالعه ای اثر پیشگیری کنندگی کروسین را بر روی القای سرطان ریه بر روی موش را بررسی کردند. که این مطالعه در هر دو مرحله شروع و پس از ترویج انجام شده است. در دو دوز ۲۰ میلی گرم از مرحله شروع و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن برای مرحله ترویج، که در هر دو گروه اثر پیشگیری کنندگی کروسین دیده شد ولی در گروهی که از مرحله شروع، پیشگیری انجام شده بود اثر پیشگیری کنندگی بیشتری دیده شد. که می توان نتیجه گرفت که کروسین در هر دو مرحله اثر پیشگیری کنندگی داشته است { *Magesh, 2006 #29* }.

در مورد تاثیر کروسین و کروسین بر تاخیر در ظهور تومور، به مقایسه دوره کمون گروه کنترل مثبت (گروه توموری بدون پیشگیری) با گروه های پیشگیری و همچنین مقایسه این تحقیق با مطالعات مشابه می پردازیم. جدول ۳-۸ نشان داد که دوره کمون در گروه کنترل مثبت ۸۱ روز بود. در مطالعات پیشگیری مشابه در سال ۲۰۰۰ آقای کوهن و همکارانش که با پروتئین سویا انجام داده بودند، دوره کمون در گروه کنترل مثبت ۸۴ روز بود که در گروه های پیشگیری که با دو غلظت متفاوت ۱۰ و ۲۰ درصد از پروتئین سویا انجام دادند به ترتیب ۱۱۶ و ۱۱۹ روز بود که تاخیر معناداری در افزایش دوره کمون حاصل شده بود

{L.A.Chohen, 2000 #65}. در سال ۲۰۰۷ آقای اورنداس و همکارانش اثر پیشگیری اتروریکو کسب را در دو غلظت ۱۰ و ۲۵ میلی گرم بر وزن بدن انجام دادند، در این تحقیق دوره کمون در گروه کنترل مثبت ۱۰۳ روز و در گروه های پیشگیری ۱۱۰ و ۱۱۱ روز بوده که افزایش دیده نشد {P. ORENDÁS, October 2, 2007 #64}. دوره کمون در این تحقیق دوره کمون در گروه کنترل ۸۱ روز بوده و در گروه پیشگیری کروسین در مرحله ترویج به ۱۱۹ روز افزایش یافته است. این نشان دهنده این است که کروسین در مرحله ترویج از القای سرطان پستان در رت اثر پیشگیری دارد. در گروه پیشگیری کروسین شروع دوره کمون به ۱۴۵ روز افزایش یافت. این تاخیر معنا دار نسبت به گروه کنترل مثبت و گروه ترویج نشان دهنده تاثیر پیشگیری کروسین از القای سرطان پستان در رت از مرحله شروع می باشد. در گروه پیشگیری با کروسیتین نیز در مرحله ترویج دوره کمون به ۱۲۷ روز افزایش یافت که این نسبت به گروه کنترل مثبت و گروه پیشگیری کروسین در مرحله ترویج افزایش داشت. گروه پیشگیری کروسیتین در مرحله شروع به ۱۵۴ روز افزایش داشت که این نشان دهنده اثر پیشگیری کروسیتین در القای تومور هم در مرحله شروع و هم در مرحله ترویج بوده است. از مقایسه کروسین و کروسیتین به این نتیجه می رسیم که در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کروسین و کروسیتین اثر پیشگیری کنندگی در هر دو مرحله شروع و ترویج در القای سرطان پستان توسط NMU را دارد.

با نتایج به دست آمده که در بالا به طور مفصل شرح داده شد، فرضیه ما مبنی بر اثرات پیشگیری کنندگی کروسین و کروسیتین بر سرطان پستان القاء شده در رت، قوت یافت. در ضمن این طور به نظر می رسد که کروسیتین اثر پیشگیری کنندگی بیشتری نسبت به کروسین داشت. درباره مکانیسم فعالیت کروسین و کروسیتین، هنوز اطلاع دقیقی در دست نیست ولی در مطالعات قبلی ما میان کنش آن ها با DNA نشان داده شد. این مطالعات نشان داد که میان کنش کروسیتین با DNA محکمتر از کروسین است {Ashrafi, 2005 #31}. همچنین گزارش شد که این مواد میان کنش RNA پلیمراز ۲ با DNA را مهار می کنند و در مطالعه دیگری نیز نشان داده شد که با هیستون H1 میان کنش دارند، که البته باز هم میان کنش

کروستین قویتر بوده است {Ashrafi, 2005 #31}. در مطالعه‌ای دیگر اثر مهار رادیکال‌های آزاد و آنزیم‌های متابولیزه‌کننده داروها نیز به اثبات رسیده است. همچنین اخیراً بر روی سلول‌های MC-F-7 و MDA-MB 231 سرطان پستان کاهش شدید رشد را در این سلول‌ها توسط کروستین به اثبات رسید {Dhar, 2009 #28}.

در این مقاله پارامترهای مختلفی مورد بررسی قرار گرفت، از جمله وزن رت‌ها در طی دوره، وزن بافت‌های آنها، حجم تومور در طی دوره، حجم نهایی تومورها، دوره کمون، درصد بروز تومور، تعداد تومور در هر گروه، بررسی هیستوپاتولوژیک تومورها و اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم EDA.

از مقایسه این پارامترها به این نتیجه رسیدیم که کروسین و کروستین هر دو دارای اثر پیشگیری‌کنندگی از القای تومورهای پستانی در رت‌های ماده و بیستار توسط NMU بودند و باعث تاخیر در بروز تومورهای پستانی، یعنی افزایش دوره کمون و کاهش حجم تومور نسبت به گروه بدون درمان شدند. بهترین وضعیت پیشگیری توسط کروستین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرام بر کیلوگرام وزن بدن در مرحله آغازین بود. کروسین و کروستین اثر معناداری بر فعالیت ویژه آنزیم EDA در مغز و تخمدان رت‌ها نداشتند.

منابع

1. Mukhopadhyay S, Ballard BR, Mukherjee S, Kabir SM, Das SK. Beneficial effects of soy protein in the initiation and progression against dimethylbenz [a] anthracene-induced breast tumors in female rats. *Mol Cell Biochem.* 2006 Oct;290(1-2):169-76.
2. Huang JP, Zhang M, Holman CD, Xie X. Dietary carotenoids and risk of breast cancer in Chinese women. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16 Suppl 1:437-42.
3. Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr.* Sep;50(8):761-86.
4. Bhat JV, Broker R. Riboflavine and thiamine contents of saffron, *Crocus sativus* linn. *Nature.* 1953 Sep 19;172(4377):544.
5. Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr.* 2007;157(13-14):315-9.
6. Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A. Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem.* 2005 Sep 7;53(18):7302-6.
7. Xi L, Qian Z, Du P, Fu J. Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine.* 2007

Sep;14(9):633-6.

8. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med* (Maywood). 2002 Jan;227(1):20-5.

9. Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev*. 2004;28(6):426-32.

10. Nair SC, Pannikar B, Panikkar KR. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett*. 1991 May 1;57(2):109-14.

11. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett*. 1996 Feb 27;100(1-2):23-30.

12. Garcia-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontanon J, Fernandez JA, Atienzar M. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rat. *Nutr Cancer*. 1999;35(2):120-6.

۱۳۱۴. Feizzadeh B, Afshari JT, Rakhshandeh H, Rahimi A, Brook A, Doosti H. Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. *Urol J*. 2008 Summer;5(3):161-7.

15. Nair SC, Salomi MJ, Panikkar B, Panikkar KR. Modulatory effects of *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice. *J Ethnopharmacol*. 1991 Jan;31(1):75-83.

16. Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. *Cancer Biother*. 1995 Winter;10(4):257-64.

17. Ashrafi M, Bathaie SZ, Taghikhani M, Moosavi-Movahedi AA. The effect of carotenoids obtained from saffron on histone H1 structure and H1-DNA interaction. *Int J Biol Macromol*. 2005 Sep 15;36(4):246-52.

18. Hoshyar R, Bathaie SZ, Ashrafi M. Interaction of safranal and picrocrocin with ctDNA and their preferential mechanisms of binding to GC- and AT-rich oligonucleotides. *DNA Cell Biol*. 2008 Dec;27(12):665-73.

19. Bathaie SZ, Bolhasani A, Hoshyar R, Ranjbar B, Sabouni F, Moosavi-Movahedi AA. Interaction of saffron carotenoids as anticancer compounds with ctDNA, Oligo (dG.dC)15, and Oligo (dA.dT)15. *DNA Cell Biol*. 2007 Aug;26(8):533-40.

۹۷-۸۵ ۲۰

21. Hasler-Strub U, Moos R. [Breast cancer: screening, treatment and follow-up]. *Praxis* (Bern 1994). 2010 Mar 31;99(7):413-8.

23. James aG. Breast cancer treatment guidelines for patients. *American Cancer Society*. 2006;8:5-30.

24. Anzano MA, Byers SW, Smith JM, Peer CW, Mullen LT, Brown CC. Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. *Cancer Res*. 1994 Sep 1;54(17):4614-7.

25. Hiroshi Inano MO. Prevention of radiation-induced mammary tumors. *Biology Contribution*. 2002;52:212-23.

26. Thompson HJ, Meeker LD. Induction of mammary gland carcinomas by the subcutaneous injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res.* 1983 Apr;43(4):1628-9.
27. Thompson HJ, Singh M. Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000 Oct;5(4):409-20.
28. Grubbs CJ, Becci PJ, Thompson HJ, Moon RC. Carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosourea and N-ethyl-N-nitrosourea when applied to a localized area of the hamster trachea. *J Natl Cancer Inst.* 1981 May;66(5):961-5.
29. Thompson HJ, Adlakha H. Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res.* 1991 Jul 1;51(13):3411-5.
30. Thompson HJ, Adlakha H, Singh M. Effect of carcinogen dose and age at administration on induction of mammary carcinogenesis by 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis.* 1992 Sep;13(9):1535-9.
31. Moon RC, Kelloff GJ, Detrisac CJ, Steele VE, Thomas CF, Sigman CC. Chemoprevention of MNU-induced mammary tumors in the mature rat by 4-HPR and tamoxifen. *Anticancer Res.* 1992 Jul-Aug;12(4):1147-53.
32. Rivera ES, Andrade N, Martin G, Melito G, Cricco G, Mohamad N. Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: histopathology and estral cycle influence. *Cancer Lett.* 1994 Nov 11;86(2):223-8.
33. Takahashi H, Uemura Y, Nakao I, Tsubura A. Induction of mammary carcinomas by the direct application of crystalline N-methyl-N-nitrosourea onto rat mammary gland. *Cancer Lett.* 1995 May 25;92(1):105-11.