

تاثیر سیاه‌دانه در فعالیت آنزیم‌های متابولیزه‌کننده سموم و سطح پروتئین بتا کاتنین در رت‌های تحت تیمار با دی‌متیل‌هیدرازین

نویسندگان: ابوالفضل دادخواه تهرانی^{۱*}، محمدرضا محمدی ملایری^۲، فائزه فاطمی^۳، علیرضا جهانبانی^۴، فاطمه ترابی^۵ و محمدحسین جمالی^۶

۱. استادیار بیوشیمی گروه پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران
۲. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار، ایران
۳. استادیار بیوشیمی، پژوهشکده چرخه سوخت پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران
۴. دانشجوی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار، ایران
۵. کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران

* نویسنده مسئول: ابوالفضل دادخواه تهرانی E-mail: dadkhah_bio@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: دی‌متیل‌هیدرازین (DMH) در کبد، توسط سیتوکروم p450 (CYP 450) به متیل‌دیانونیوم متابولیزه شده که با ایجاد جهش در ژن بتاکاتنین و عدم تخریب آن توسط سیستم یوبی کوئیتین به افزایش سطح آن و در نتیجه، افزایش بیان برخی از آنکوژن‌ها و ایجاد تومور در کولون منجر می‌شود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۸ سر رت به شش گروه تقسیم شدند. سرطان کولون از طریق تزریق DMH (20 mg/kg b.w) هفته‌ای یکبار به مدت هجده هفته در رت‌ها القا شد و تأثیر مصرف غذای حاوی پودر سیاه‌دانه ۲ و ۴ درصد در مهار ایجاد تومورهای کولون، مورد بررسی قرار گرفت؛ پس از اتمام دوره تیمار (هفت ماه)، بافت‌های کبد و کولون جدا شدند. فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون S-ترانسفراز (GST) و CYP 450 و سطح گلوکوتاتیون (GSH) در کبد و همچنین سطح بتا کاتنین در کولون اندازه‌گیری شد. تعداد و سایز تومورها و آسیب‌های پاتولوژیک بافت کولون نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: غذای حاوی سیاه‌دانه در هر دو دز به کاهش تعداد و اندازه (سایز) تومورها منجر شده است؛ همچنین DMH باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های GST و CYP 450 و سطح GSH و بتا کاتنین شده و سیاه‌دانه به متعادل شدن سطح آنها منجر می‌شود.

نتیجه‌گیری: مصرف غذای حاوی سیاه‌دانه، به احتمال از طریق تأثیر روی فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا و همچنین سطح آنکوژن بتا کاتنین، به مهار تومورهای کولون منجر می‌شود.

واژگان کلیدی: سرطان کولون، سیاه‌دانه، بتا کاتنین.

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ودوم-شماره ۱۱۷
تیر ۱۳۹۴

دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۰۸

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۴/۰۳/۱۷

پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۲۳

مقدمه

میوه‌جات، سبزیجات و فیبرهای موجود در رژیم غذایی با تحت تأثیر قراردادن فلور روده، خطر ابتلا به CRC را کاهش می‌دهند (۴). مصرف مواد غذایی با خاصیت chemopreventive از جمله گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی نیز در جلوگیری، به تأخیر انداختن یا معکوس کردن روند سرطان‌زایی نقشی مهم را برعهده دارند (۵).

گیاهان دارویی نیز به دلیل دارا بودن مزیت‌هایی بسیار از جمله ارزانی، دردسترس بودن و پذیرش بهتر از جانب بیماران برای درمان بیماری‌های مانند سرطان، مورد توجه قرار گرفتند؛ یکی از این گیاهان دارویی که به آن توجه شده، سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) است. سیاه‌دانه گیاهی است ۱ ساله، علفی و از تیره آلاله (*Ranunculaceae*) که حدود ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر طول دارد (۶). اسانس سیاه‌دانه، شامل تیموکینون (*Thymoquinone*)، *p*-*cymene*، کارواکرول *4*-*anethol*، *terpineol* و *longifoline* است (۷). بقیه ترکیبات سیاه‌دانه شامل استروئول‌ها، تری‌اسیل گلیسرول‌ها، فسفولیپیدها، تانن‌ها، رزین‌ها، هیدروکسی‌کتون‌ها، پلی‌فنول‌ها، توکروفرول‌ها و ویتامین‌ها هستند (۸).

سیاه‌دانه دارای آثار درمانی قابل توجه از جمله آثار «آنتی‌اکسیدانی، ضد درد و ضد التهاب، ضد سرطان و ضد جهش، ضد سمیت کبدی و کلیوی، ضد دیابتی، تأثیرگذاری روی سیستم ایمنی و ضد اولسر» است (۷). روغن سیاه‌دانه و ترکیب‌های جدا شده از آن، آثاری مشخصی علیه سلول‌های سرطانی انسانی دارند و همچنین، سمیت متداول داروهای ضد سرطان را کاهش می‌دهند (۹). یکی از موارد تأثیرگذار مهم سیاه‌دانه، تیموکینون است که دارای اثرهای فارماکولوژیکی متعدد از جمله اثر ضد سرطانی است (۱۰).

در مطالعه‌ای که بارک و همکاران انجام دادند، آثار ضد سرطانی این گیاه، روی چند رده سلول سرطانی

سرطان کولورکتال (CRC)، یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است؛ این بیماری با شیوع ۶ تا ۸ در هر ۱۰۰ هزار نفر، چهارمین نوع شایع سرطان محسوب می‌شود و یک پنجم کل موارد سرطان در ایران را، CRC تشکیل می‌دهد. جمعیت جوان کشور، درصدی بالا از افراد مبتلا به CRC را تشکیل می‌دهند که در این میان، ساختار سنی جوان کشور، بروز زود هنگام این بیماری (کمتر از ۴۰ سال) و شیوع کمتر آن در افراد مسن، بی‌تأثیر نیستند (۱). سرطان کولورکتال، به دو دسته کلی ارثی و غیر ارثی یا اسپورادیک (*sporadic*) طبقه‌بندی می‌شود؛ نوع غیر ارثی یا اسپورادیک در حدود ۶۵ تا ۹۵ درصد کل موارد CRC را شامل می‌شود. عوامل رژیم‌ی و محیطی اعم از چربی‌های حیوانی و گوشت قرمز، فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی، کتواستروئیدها (محصول متابولیسمی کلاسترول)، محصول‌های پیرولیز (ترکیب‌های حاصل از کباب‌کردن یا سرخ کردن گوشت)، مصرف روزانه الکل و مصرف داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی در بروز CRC اسپورادیک دخیل‌اند. (۲)

روش‌هایی مختلف برای درمان CRC با توجه به مرحله بیماری وجود دارند. امروزه استفاده از داروهای گوناگون ضد التهابی و نیز داروهای شیمی‌درمانی، از مؤثرترین راه‌های درمان برای تومورهای متاستاتیک هستند. اگرچه علاوه بر عوارض ایجاد شده، طی دوره درمان توسط این داروها، مقاومت هم‌زمان سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای مختلف، هنوز یکی از موانع بزرگ بر سر راه درمانی موفق به‌شمار می‌رود (۳)؛ از این رو به‌نظر می‌رسد که پیشگیری از این بیماری با دیگر روش‌های درمانی رژیم غذایی و داروهای گیاهی مورد استفاده در طب سنتی می‌تواند تأثیری بسزا در بروز یا کاهش شدت آن داشته باشد.

از سال‌ها پیش مشخص شده است که رژیم غذایی در بروز و پیشگیری از CRC، نقشی مهم را ایفا می‌کند.

فرصیه پژوهش حاضر، این است که DMH به افزایش فعالیت آنزیم‌های GST و CYP 450 و سطح بتاکاتنین و در نتیجه ایجاد تومور در کولون منجر می‌شود؛ همچنین، سیاه‌دانه با جلوگیری از تغییر در عوامل بالا، کاهش تومورهای کولون را سبب می‌شود؛ بنابراین، هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیر سیاه‌دانه بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم دی‌متیل‌هیدرازین (GST CYP 450 و سطح GSH است که در فعال‌سازی و همچنین دفع این کارسینوژن نقش دارند؛ به‌علاوه، بررسی تأثیر سیاه‌دانه بر سطح بتاکاتنین که به‌طور مستقیم، مسئول ایجاد تومورهای کولون است، از اهداف دیگر این تحقیق به‌شمار می‌آید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از رت‌های نر بالغ با وزن متوسط ۱۲۰ گرم استفاده شد؛ رت‌ها از مراکز نگهداری حیوان‌های آزمایشگاهی از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. غذای حیوان‌ها از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران تهیه شده که به‌صورت pallet با فرمول استاندارد بود؛ حیوان‌های بالغ نیز به‌طور آزاد، به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری دسترسی داشتند. کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، شرایط کار با حیوان‌ها را تأیید کرد.

القای سرطان کولون در رت‌ها

ابتدا کارسینوژن دی‌متیل‌هیدرازین (DMH) در EDTA ۱ میلی‌مولار، حل و به‌منظور پایداری کارسینوژن، PH آن به ۶/۵ رسانده شد؛ سپس DMH به مدت هجده هفته، هفته‌ای یک‌بار با دوز 30mg/kg b.w به‌صورت زیرجلدی (s.c) در ناحیه کتف به رت‌ها تزریق شد (۱۸).

همچنین پس از تهیه دانه سالم گیاه و اطمینان از سلامت ظاهری و آسیاب‌کردن، پودر سیاه‌دانه در غلظت‌های ۲ و ۴ درصد (وزنی/وزنی) با غذای پودر شده و استاندارد رت، مخلوط و دوباره، غذای palletted تولید شد (۲۵). در طول دوره تیمار، رت‌ها

از جمله سرطان پستان، کلیه و قلب نشان داده شد (۱۱)؛ در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۰، طبسی و همکاران انجام دادند، مشخص شد که عصاره الکلی سیاه‌دانه، موجب کاهش معنی‌دار میزان تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی کلیه انسان رده ACHN می‌شود (۱۲).

موتاسیون بتا کاتنین در انواع تومورهای کولون که با کارسینوژن‌های مختلف از جمله دی‌متیل‌هیدرازین (DMH) القاشده‌اند، دیده می‌شود (۱۳). بتا کاتنین، عضوی کلیدی در مسیر پیام‌رسانی بیولوژیک بوده که نقشی خیلی مهم را در رشد و نمو طبیعی سلول از طریق پیام‌رسانی Wnt^۱ برعهده دارد؛ در صورت عدم پیام‌رسانی wnt، بتا کاتنین فسفریله شده، توسط سیستم یوئیکوئیتین، شناخته و در کمپلکس پروتئازوم تجزیه می‌شود؛ در صورت وجود پیام Wnt، فسفریلاسیون بتا کاتنین، متوقف می‌شود و این پروتئین با عوامل رونویسی از خانواده LEF/TCF^۲، کمپلکس تشکیل می‌دهد؛ کمپلکس بالا به افزایش بیان آنکوژن‌هایی نظیر C-myc و Cyclin D1 منجر می‌شود که در نهایت به ایجاد سرطان می‌انجامد (۱۴).

DMH، یک پروکارسینوژن قوی بوده که پس از فعال‌سازی توسط سیتوکروم p450 در کبد، باعث متیلاسیون بازهای گوانین در DNA بافت‌های مختلف از جمله کولون، ایلتوم و کبد و تغییر بیان ژن‌ها و در نهایت، ایجاد تومور می‌شود (۱۵)؛ متابولیت فعال DMH، سپس توسط آنزیم گلوکوتایون s- ترانسفراز (GST) با گلوکوتایون، ترکیب و در ادرار و صفرا دفع می‌شود (۱۶)؛ همچنین، مطالعه‌ای دیگر نشان می‌دهد که DMH به افزایش بیان ژن بتا کاتنین مستقل از متیلاسیون و تخریب آن منجر می‌شود که این امر نیز به افزایش سطح بتا کاتنین در سلول و پیشبرد روند سرطان می‌انجامد (۱۷).

^۱- Wnt signaling

^۲- Lymphoid Enhancer Factor/T Cell Factor

حیوان‌ها به‌صورت تصادفی در شش گروه تقسیم شدند (۸ سر رت در هر گروه) و به‌صورت زیر تیمار شدند (جدول ۱):

به‌طور متوسط روزانه 50 gr/kg bw غذای حاوی پودر سیاهدانه ۲ و ۴ درصد مصرف کردند؛ بنابراین در گروه‌های تیمار، به‌طور متوسط حیوان‌ها به ترتیب، ۱ و ۲ gr/kg bw سیاهدانه دریافت کردند؛ در مرحله بعدی،

جدول ۱. گروه‌های درمانی

ردیف	گروه‌های تیمار	EDTA	DMH	غذای حاوی سیاهدانه	
				2%	4%
۱	کنترل	+	-	-	-
۲	سیاهدانه ۲٪	+	-	+	-
۳	سیاهدانه ۴٪	+	-	-	+
۴	DMH	-	+	-	-
۵	سیاهدانه ۲٪ + DMH	-	+	+	-
۶	سیاهدانه ۴٪ + DMH	-	+	-	+

بررسی هیستوپاتولوژیکی بافت کولون شش ماه پس از آغاز آزمایش، حیوان‌ها بیهوش شدند و بافت کولون آنها برای مطالعات هیستوپاتولوژیکی جدا شد؛ بدین منظور، بی‌درنگ، پس از جدا کردن کولون، یک برش طولی از سکوم تا آنوس در آن زده و در محلول PBS شسته شد؛ در مرحله بعد، روده به سه قسمت ابتدایی، میانی و انتهایی (a, b, c)، تقسیم و تعداد تومورها در هر منطقه شمارش و اندازه آنها با کولیس اندازه‌گیری شد؛ در ادامه، نمونه‌ها میان دو تکه کاغذ صافی ساندویچ شده، در بافر فرمالین قرار داده شدند. نمونه‌ها در متیلن بلو ۰/۲ درصد سالین به مدت ۲ تا ۳ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و روی اسلاید میکروسکوپی قرار گرفتند (۱۹). اسلایدهای تهیه شده به‌منظور مقایسه تغییرهای بافتی در نمونه‌های مختلف با میکروسکوپ نوری دارای بزرگ‌نمایی ۴۰، بررسی و از آنها عکس‌برداری شد و تغییرهای هیستولوژیکی تجزیه و تحلیل شدند.

گروه کنترل: رت‌ها در این گروه، ۰/۵ میلی‌لیتر EDTA به‌عنوان حلال DMH هفته‌ای یک‌بار به مدت هجده هفته به‌صورت زیرجلدی دریافت و از غذای معمولی استفاده کردند.

گروه DMH: رت‌ها در این گروه، ۰/۵ میلی‌لیتر DMH حل‌شده در EDTA (30 mg/kg b.w) هفته‌ای یک‌بار به مدت هجده هفته به‌صورت زیرجلدی دریافت و از غذای معمولی استفاده کردند.

گروه‌های شم: در این گروه‌ها همانند گروه کنترل به حیوان‌ها، EDTA تزریق شد و همچنین رت‌ها به ترتیب، غذای حاوی سیاهدانه ۲ و ۴ درصد را به مدت شش ماه دریافت کردند

گروه‌های تیمار: رت‌ها در این گروه‌ها، همانند گروه پیشین، DMH دریافت کردند و همچنین غذای حاوی سیاهدانه ۲ و ۴ درصد را به مدت شش ماه مصرف کردند. پس از گذشت شش ماه از آغاز تیمار، حیوان‌ها با دی‌اتیل‌اتر، بیهوش و به‌منظور انجام آزمایش‌ها، بافت‌های کبد و روده آنها جمع‌آوری شدند (۱۸).

اندازه‌گیری میزان پروتئین بتاکاتین در هموژن بافت کولون

اندازه‌گیری میزان پروتئین بتاکتین به روش ELISA در هموژن بافت کولون با استفاده از کیت خریداری‌شده از شرکت (U.S.A) Assay Designs و مطابق با پروتکل کیت انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام داده‌های حاصل از گروه‌های تجربی با استفاده از نرم‌افزار SPSS توسط آزمون one-way ANOVA و آزمون تعقیبی توکی، محاسبه و در شش گروه کلی مطرح‌شده در روش اجرا مقایسه شدند؛ همچنین با استفاده از این نرم‌افزار، سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) محاسبه شد.

نتایج

تأثیر سیاه‌دانه روی تعداد و اندازه (سایز) تومورها در کولون

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، در تمامی گروه‌ها به جز، گروه‌های کنترل منفی و شم، تومورهای کولون بر اثر تزریق DMH ایجاد شده‌اند. به‌طور کلی، ۴ تومور در قسمت a به‌عنوان بخش ابتدایی، ۳۳ تومور در قسمت b به‌عنوان بخش میانی و ۸۸ تومور در قسمت c به‌عنوان بخش انتهایی کولون در کلیه حیوانات مشاهده شد. نتایج بررسی‌های ماکروسکوپی نشان می‌دهند که میانگین تعداد و اندازه تومورها در سرتاسر طول کولون در گروه‌هایی که با غذای حاوی سیاه‌دانه ۲ و ۴ درصد تغذیه شده‌اند، به‌طور معنی‌داری، کمتر از گروه DMH است ($P < 0.05$) که همین‌الگو در قسمت‌های a، b و c کولون نیز مشاهده می‌شود (جدول ۲)؛ البته، میانگین تعداد تومورها در قسمت‌های a و b کولون گروه تیمار با سیاه‌دانه ۲ درصد، تفاوتی معنی‌دار را با گروه DMH نشان نمی‌دهد.

تهیه هموژن بافت کبد و کولون و پلاسما

بخشی از نمونه‌های بافت کولون و کبد، جدا و در یک لوله آزمایش با بافر فسفات سالین (PBS) سرد ($PH=7/3$)، مخلوط شد و توسط دستگاه هموژنایزر، بافت همگن شد و هموژن ۲۰ درصد وزنی - حجمی تهیه شد. اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم گلوکوتایون S - ترانسفراز در هموژن بافت کبد

فعالیت آنزیم GST به روش Habig (۲۰) و با استفاده از سوبسترای CDNB توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد؛ در این روش، آنزیم GST موجود در نمونه به اتصال CDNB به گلوکوتایون، منجر و در نهایت، جذب کمپلکس حاصل با گذشت زمان در طول موج ۳۴۰ nm اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم براساس واحد آنزیم به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری شده با آزمون برادفورد (۲۱)، محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم سیتوکروم P450 در هموژن بافت کبد

فعالیت ویژه آنزیم سیتوکروم p450 با استفاده از آزمون EROD (ethoxy resufin - o - deethylase) مطابق با روش Buke and Mayer توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتری اندازه‌گیری شد (۲۲).

اندازه‌گیری میزان گلوکوتایون احیا (GSH) در هموژن بافت کبد

GSH با استفاده از معرف Ellman's و براساس روش Lindsay و Seldak (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد (۲۳)؛ در این روش گلوکوتایون با ترکیبی به نام دی‌تیونیترو بنزوئیک اسید (DTNB)، کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که در طول موج ۴۱۲ nm جذب دارد؛ در نهایت، میزان GSH به کمک منحنی استاندارد محاسبه شد.

جدول ۲. تأثیر سیاهدانه بر تعداد و اندازه تومورها در قسمت‌های ابتدایی، میانی، انتهایی و کل طول کولون در رت‌های تحت تیمار با DMH

گروه‌های تیمار	تعداد رت‌های مورد آزمایش	تعداد رت‌های دارای تومور	تعداد کل تومور				تعداد تومور در هر رت				سایز تومور (mm ²)			
			a	b	c	T	a	b	c	T	A	B	c	T
کنترل	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
سیاهدانه ۲٪	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
سیاهدانه ۴٪	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
DMH	8	8	4	15	34	53	0.5±0.3*	1.9±0.7*	4.2±0.9*	6.6±1.1*	3.6±2.8*	58.3±21*	102.3±26.2*	164.2±34.6*
سیاهدانه ۲٪ + DMH	8	8	0	10	29	39	0**	1.3±0.7	3.5±0.7	4.8±0.6**	0**	24.8±10.9**	62.6±10.7*	87.4±8.3**
سیاهدانه ۴٪ + DMH	8	7	0	8	25	33	0**	1±0.6**	3.1±0.6**	4.1±1**	0**	6.14±4**	34.8±7.2**	40.9±9.7**

کاهش یافته است؛ همچنین تیمار رت‌ها با غذای حاوی سیاهدانه ۲ و ۴ درصد به مهار تشکیل تومور به ترتیب به میزان ۲۶ و ۳۸ درصد منجر شده است؛ همچنین در جدول ۳ مشاهده می‌شود که بیشترین میزان تشکیل تومور به ترتیب در قسمت‌های انتهایی، میانی و ابتدایی است ولی بیشترین درصد مهار تومور، در قسمت ابتدایی کولون مشاهده می‌شود.

تأثیر سیاهدانه روی درصد ابتلا و درصد مهار تومورها در کولون
 پس از اتمام دوره هفت ماه تیمار حیوانات، تومورهای کولون در تمام حیواناتی که DMH دریافت کردند با چشم غیر مسلح، قابل مشاهده بودند. (شکل ۱)؛ با وجود این، سیاهدانه در هر دو دز، قادر به مهار تشکیل تومورها بوده است (جدول ۳). درصد ابتلا به تومور در گروه تیمار سیاهدانه ۴ درصد به ۸۷ درصد



شکل ۱. نمای ماکروسکوپی از تومورهای کولون

جدول ۳. تأثیر سیاه‌دانه بر درصد ابتلا به تومور و درصد مهار تومور در قسمت‌های ابتدایی، میانی، انتهایی و کل طول کولون در رت‌های تحت تیمار با DMH

گروه‌های تیمار	تعداد رت‌های مورد آزمایش	تعداد رت‌های دارای تومور	درصد ابتلا به تومور				درصد مهار تومور			
			a	b	C	T	A	b	c	T
کنترل	8	0	0	0	0	0	-	-	-	-
سیاه‌دانه ۲٪	8	0	0	0	0	0	-	-	-	-
سیاه‌دانه ۴٪	8	0	0	0	0	0	-	-	-	-
DMH	8	8	38	75	100	100	0	0	0	0
سیاه‌دانه ۲٪ + DMH	8	8	0	50	100	100	100	33	15	26
سیاه‌دانه ۴٪ + DMH	8	7	0	87	87	87	100	46	26	38

شواهد تأثیر سیاه‌دانه، کاهش تعداد تومورهای tubular adenoma و carcinoma in situ در قسمت ابتدایی کولون و همچنین، کاهش تعداد تومورهای adenocarcinoma invasive در قسمت‌های میانی، انتهایی و کل طول کولون در هر دو گروه تیمار سیاه‌دانه نسبت به گروه DMH است؛ به عبارت دیگر با وجود افزایش تعداد تومورهای carcinoma in situ در گروه‌های تیمار با سیاه‌دانه، کاهش تعداد تومورهای adenocarcinoma invasive و همچنین، تعداد کل تومورها در این گروه‌های تیمار نسبت به گروه DMH، نشان‌دهنده مهار تشکیل و پیشرفت تومورها توسط سیاه‌دانه است (جدول ۴).

تأثیر سیاه‌دانه روی مراحل پیشرفت تومورها در کولون نقش مصرف غذای حاوی سیاه‌دانه روی تعداد تومورها در قسمت‌های ابتدایی، میانی و انتهایی کولون براساس طبقه‌بندی مراحل پیشرفت تومور در جدول ۴ مشاهده می‌شود. در سرتاسر طول کولون در گروه DMH، تعداد ۵۳ تومور در مراحل پیشرفت مختلف؛ در گروه تیمار با سیاه‌دانه ۲ درصد، ۳۹ و در گروه تیمار با سیاه‌دانه ۴ درصد، ۳۳ تومور مشاهده می‌شوند. لازم به یادآوری است که در مراحل پیشرفت سرطان، ابتدا tubular adenoma سپس carcinoma in situ و در نهایت، adenocarcinoma invasive شکل می‌گیرند. از شاخص‌ترین

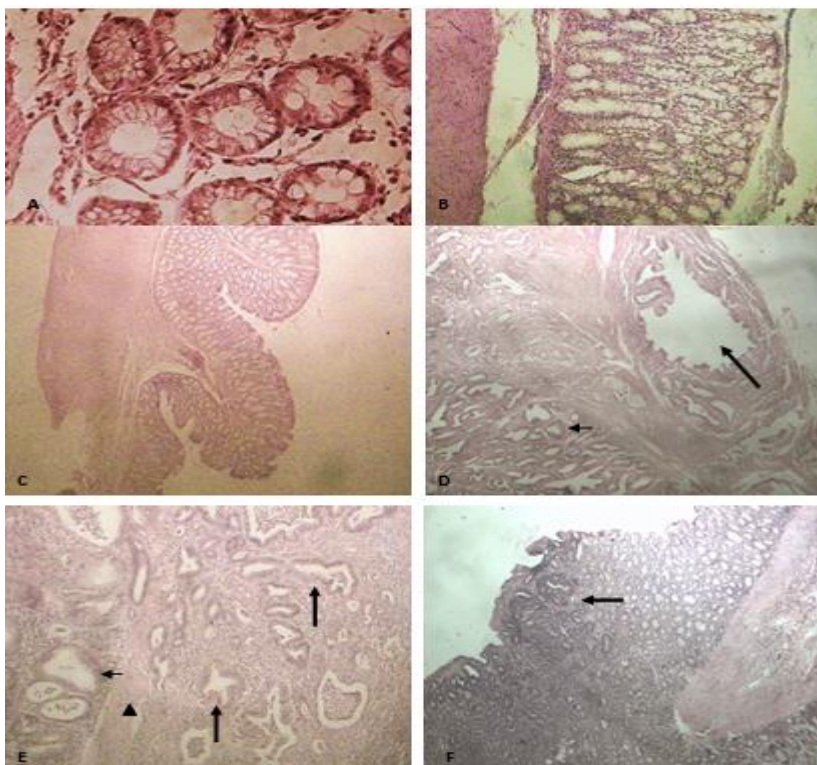
جدول ۴. تأثیر سیاه‌دانه بر مراحل پیشرفت تومور در قسمت‌های ابتدایی، میانی، انتهایی و کل طول کولون در رت‌های تحت تیمار با DMH

گروه‌های تیمار	مراحل پیشرفت تومور											
	Tubular adenoma				Carcinoma in situ				Adenocarcinoma invasive			
	a	b	c	T	a	b	c	T	a	b	C	T
کنترل	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سیاه‌دانه ۲٪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سیاه‌دانه ۴٪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMH	3	1	0	4	1	3	0	4	0	11	34	45
سیاه‌دانه ۲٪ + DMH	0	4	0	4	0	2	5	7	0	4	24	28
سیاه‌دانه ۴٪ + DMH	0	3	0	3	0	0	9	9	0	5	16	21

مشاهدات هیستوپاتولوژی تومورهای کولون القا شده توسط DMH

در بافت کولون رت‌ها در گروه‌های اول تا سوم (گروه کنترل منفی و گروه‌های شم)، غدد لیبرکون نرمال همراه با لایه‌های مخاطی و زیرمخاطی طبیعی مشاهده می‌شوند؛ به‌طور کلی، ساختار کولون در این گروه‌ها طبیعی و شبیه به هم است و هیچ نشانه‌ای از بدخیمی مشاهده نمی‌شود (شکل 2A تا 2C). مطالعات هیستوپاتولوژی بافت کولون رت‌ها در گروه چهارم (گروه DMH)، تومورهایی از نوع adenocarcinoma invasive را در این حیوانات نشان می‌دهند؛ همچنین، ساختار غیرطبیعی و دیسپلازی در غدد لیبرکون نیز قابل مشاهده است؛ در این گروه، تهاجم سلول‌های سرطانی به لایه‌های عضلانی مشاهده می‌شود و ساختارهای شبیه به غدد سازمان‌یافته قابل‌ردیابی‌اند

(شکل 2D). در گروه پنجم (گروه تیمار با سیاه‌دانه ۲ درصد) نیز adenocarcinoma invasive مشاهده می‌شود؛ پرولیفراسیون سلول‌های توموری و همچنین ساختارهای شبیه به غدد سازمان‌یافته نیز در کولون این حیوانات قابل‌ردیابی‌اند؛ همچنین تهاجم سلول‌های سرطانی به لایه زیرمخاطی نیز قابل‌مشاهده است (شکل 2E). بررسی‌های هیستوپاتولوژی بافت کولون حیوانات تیمار شده با سیاه‌دانه ۴ درصد (گروه ششم)، وجود tubular adenoma را نشان می‌دهد. بافت اپیتلیوم‌های پرپلاستیک غدد به وسیله غشای پایه، محصور شده است. سلول‌های دیسپلاستیک همراه با هسته و هستک‌های بزرگ و نشانه‌های pleomorphism, hyperchromasia وجود carcinoma insitu را نشان می‌دهند (شکل 2F).



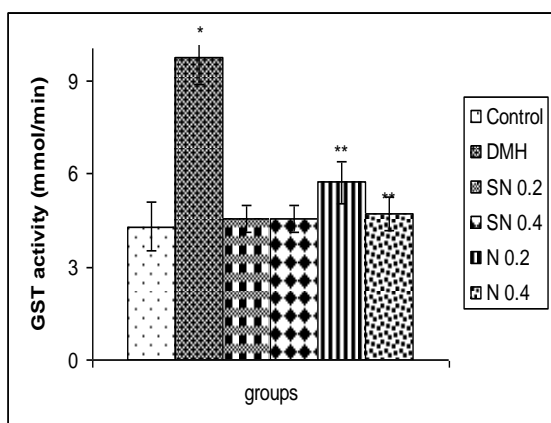
شکل ۲. تغییرهای هیستوپاتولوژیک بافت کولون

(A) بافت کولون در گروه کنترل، سلول‌های اپیتلیال طبیعی و غدد لیبرکون نرمال را نشان می‌دهد که توسط غشای پایه، محصور شده‌اند و هیچ نشانه‌ای از آسیب مشاهده نمی‌شود (*H&E, 400). (B&C) نتایج بررسی‌های هیستوپاتولوژیک بافت کولون در گروه‌های sham (گروه‌های دوم و سوم) نشان می‌دهند که همانند گروه کنترل منفی، در بافت کولون این حیوانات نیز هیچ تغییر میکروسکوپی مشاهده نمی‌شود. ساختار مخاط و سلول‌های اپیتلیال غدد به‌طور کامل، طبیعی هستند (*H&E, 400).

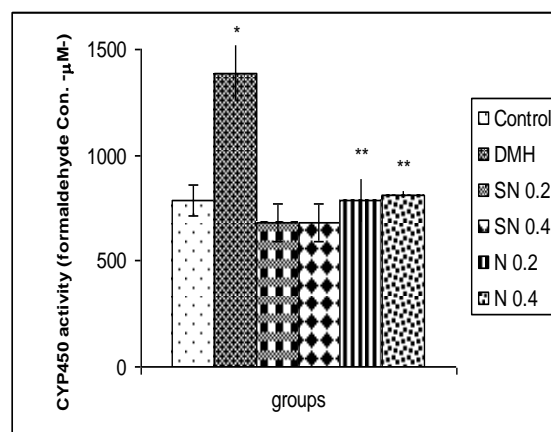
(D) مطالعات میکروسکوپی بافت کولون در گروه DMH، وجود adenocarcinoma invasive را نشان می‌دهد. دیسپلازی و ساختار غیرطبیعی غدد لیبرکون در قسمت پایین سمت چپ شکل دیده می‌شود (فلش کوچک)؛ تهاجم سلول‌های نئوپلاستیک به لایه عضلانی و ساختارهای شبیه به غدد سازمان‌یافته نیز مشاهده می‌شود (فلش بزرگ)، (*H&E, 400).

(E) بررسی هیستوپاتولوژی بافت کولون در گروه تیمار سیاه‌دانه ۲ درصد، پرولیفراسیون سلول‌های توموری و ساختارهای شبیه به غدد سازمان‌یافته (adenocarcinoma invasive) را نشان می‌دهد (فلش کوچک). سلول‌های توموری در حال تهاجم به لایه زیرمخاطی (نوک پیکان) و ساختارهای شبیه به غدد سازمان‌یافته همراه با cystic dilation (فلش بزرگ) نیز قابل‌رديابی هستند (*H&E, 400).

(F) مطالعات هیستوپاتولوژی بافت کولون در گروه تیمار سیاه‌دانه ۴ درصد، اپیتلیوم‌های پیرپلاستیک غدد با ساختارهای توبولار سازمان‌دهی‌شده را نشان می‌دهند که توسط غشاءهای پایه احاطه شده‌اند (Tubular adenoma). سلول‌های دیسپلاستیک همراه با علایمی از pleomorphism و hyperchromasia و همچنین هسته و هستک‌های بزرگ‌تر، وجود carcinoma insitu را در برخی از تومورها نشان می‌دهند (فلش)، (*H&E 40).



شکل ۴. تأثیر سیاه‌دانه روی فعالیت GST در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH



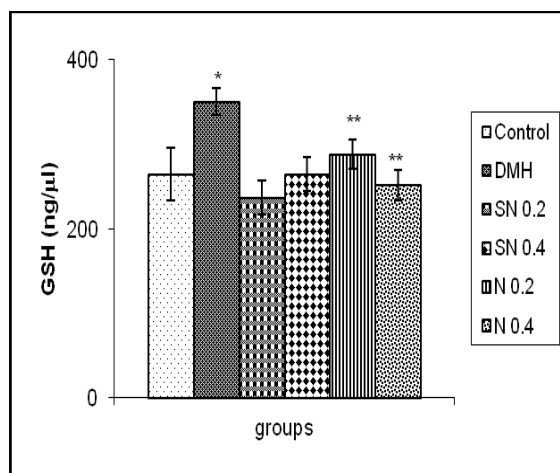
شکل ۳. تأثیر سیاه‌دانه روی فعالیت CYP450 در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH

تأثیر سیاه‌دانه روی سطح گلوکوتایون احیا (GSH) در کبد شکل ۵، میزان گلوکوتایون در هموزن بافت کبد کلیه گروه‌ها را نشان می‌دهد. سطح GSH در گروه DMH، به‌صورتی معنی‌دار، بیشتر از مقدار آن در گروه کنترل منفی است ($P < 0.05$). تیمار رت‌ها با غذای حاوی سیاه‌دانه در هر دو دز به کاهش معنی‌دار سطح گلوکوتایون در مقایسه با گروه DMH منجر می‌شود ($P < 0.05$) (شکل ۵).

تأثیر سیاه‌دانه روی فعالیت آنزیم‌های متابولیزه‌کننده سموم (GST و CYP450) در کبد همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم CYP450 در کبد حیوان‌هایی که DMH دریافت کرده‌اند، افزایشی معنی‌دار را نسبت به گروه کنترل منفی نشان می‌دهد ($P < 0.05$). مصرف غذای حاوی سیاه‌دانه در هر دو دز، قادر به کاهش دادن فعالیت این آنزیم در بافت کبد است ($P < 0.05$)؛ همچنین تزریق DMH با الگوی مشابه با CYP450 به القای فعالیت آنزیم GST منجر می‌شود (شکل ۴) به‌طوری‌که فعالیت این آنزیم در گروه DMH به‌صورتی معنی‌دار، بیشتر از فعالیت آن در گروه کنترل منفی است ($P < 0.05$)؛ فعالیت آنزیم GST نیز، همانند CYP450 در گروه‌های تیمار با غذای دارای سیاه‌دانه ۲ و ۴ درصد به‌صورتی معنی‌دار در مقایسه با گروه DMH، کمتر است ($P < 0.05$) (شکل ۴).

بحث

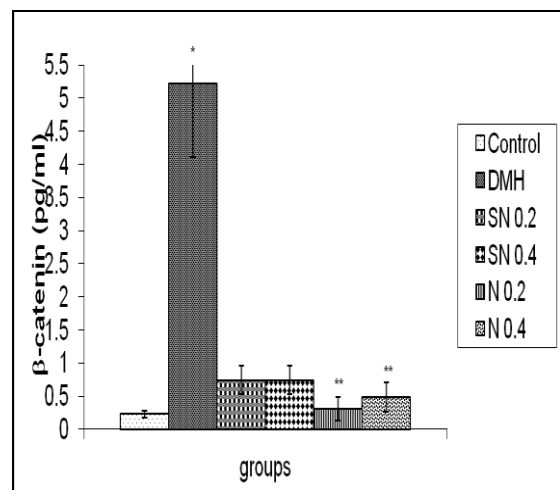
نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که تغذیه رت‌ها با غذای حاوی سیاهدانه به‌طور مؤثری، باعث کاهش تعداد تومورهای کولون، طی فرایند سرطان‌زایی القا شده توسط DMH می‌شود. مهار القای تومورها به میزان ۲۶ و ۳۸ درصد در رت‌های تغذیه شده با غذای حاوی سیاهدانه ۲ و ۴ درصد (جدول ۳)، می‌تواند نشان‌دهنده آثار ضد توموری سیاهدانه باشد. تاکنون تحقیق‌هایی مختلف در خصوص آثار ضدسرطانی ترکیب‌های استخراج شده از گیاهان دارویی صورت گرفته‌اند؛ برای نمونه، نتایج تحقیق‌های گذشته ما نشان می‌دهند که اسانس زیره سیاه با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم DMH به کاهش تومورهای کولون منجر شده است (۲۴)؛ همچنین در مطالعه‌ای که بارک و همکاران انجام دادند، آثار ضدسرطانی سیاهدانه، روی چند رده سلول سرطانی از جمله سرطان پستان، کلیه و قلب نشان داده شد (۲۵)؛ با وجود این، در خصوص آثار ضدسرطانی سیاهدانه و به‌ویژه سازوکار احتمالی خواص ضدسرطانی آن، مطالعه‌ای صورت نگرفته است؛ به همین دلیل در این تحقیق، آثار ضدسرطانی سیاهدانه در کاهش تومورهای القا شده توسط DMH و همچنین سازوکار این آثار در مدل سرطان کولون القا شده توسط DMH در رت تا حدودی بررسی شد؛ نتایج این مطالعه، همانند سایر مطالعات (۲۶) نشان می‌دهند که تیمار حیوان‌ها با DMH (۳۰ میلی‌گرم به‌ازای کیلوگرم وزن بدن)، به‌صورت تزریق زیرجلدی هفته‌ای یک‌بار به‌مدت هجده هفته، پس از گذشت شش ماه به ایجاد چندین تومور به‌ویژه در قسمت انتهایی کولون منجر می‌شود (جدول ۲).



شکل ۵. تأثیر سیاهدانه روی میزان گلوکوتایون اجیا (GSH) در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH

تأثیر سیاهدانه روی سطح b-catenin در کولون

همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، تزریق DMH به افزایش معنی‌دار سطح b-catenin در بافت کولون منجر می‌شود ($P < 0.05$)؛ به طوری که سطح b-catenin در گروه DMH بیش از ۲۲ برابر سطح آن در گروه کنترل منفی است. تیمار حیوان‌ها با غذای دارای سیاهدانه، در هر دو دز، به مهار افزایش سطح b-catenin می‌انجامد؛ به طوری که سطح این پروتئین در گروه‌های تیمار، به‌طور تقریبی، مشابه گروه کنترل منفی است (شکل ۶).



شکل ۶. تأثیر سیاهدانه روی میزان بتا کاتنین در کولون رت‌های تحت تیمار با DMH

کبد، مهم‌ترین اندامی است که بیشتر ترکیب‌های سمی از جمله داروها و مواد سرطان‌زا در آن متابولیزه می‌شوند (۳۰)؛ بنابراین، تغییرهای بیوشیمیایی ایجاد شده در بافت کبد در فرایند ایجاد سرطان توسط DMH می‌توانند به‌عنوان شاخص‌هایی (مارک‌هایی) برای بررسی خواص ضدسرطانی ترکیب‌های مختلف استفاده شوند. DMH یک کارسینوژن محیطی شناخته شده است که پس از تزریق، ابتدا در کبد توسط آنزیم سیتوکروم P450 متابولیزه می‌شود و متابولیت فعالی به نام متیل‌دیازونیوم تولید می‌کند. این متابولیت فعال، سپس توسط فعالیت آنزیم‌های فاز ۲ متابولیسیم سموم به‌ویژه GST با گلوکوتایون ترکیب و دفع می‌شود (۳۱). تزریق DMH، باعث افزایشی معنی‌دار در فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 در بافت کبد شده است و دریافت رژیم غذایی حاوی سیاه‌دانه توسط رت‌ها به مدت شش ماه، بازگشت فعالیت آنزیم کبدی به حد طبیعی را در پی داشته است (شکل ۳)؛ به موازات آن، یکی از آنزیم‌های دخیل در فاز II متابولیسیم مواد سمی یعنی GST که در بافت کبد توسط DMH مهار شده بود، در بافت کبد رت‌های تحت تیمار با سیاه‌دانه به حد طبیعی خود در گروه کنترل بازگشته است (شکل ۴).

نتایج تحقیق‌های کراول^۱ و همکارانش نیز نشان می‌دهند که فعالیت ضدسرطانی بلوکه‌کننده مونوترپین‌ها در طول مراحل اولیه سرطان‌زایی به احتمال، به دلیل تغییر در فعالیت آنزیم‌های فاز I و II متابولیزه‌کننده مواد سمی است که به سم‌زدایی کارسینوژن‌ها منجر می‌شود (۳۲)؛ با توجه به این نتایج و همچنین دیگر مطالعات می‌توان گفت که یکی از سازوکارهای ضدسرطانی این‌گونه ترکیب‌ها، مداخله آنها در تشکیل متابولیت‌های فعال در بافت کبد است (۳۳، ۳۴). سیتوکروم P450، متابولیسیم گزنوبیوتیک‌ها را در فاز ۱ متابولیسیم مواد سمی برعهده داشته (۳۵)،

بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی در بیوپسی بافت کولون، وجود انواع ضایعات مرتبط با سرطان از جمله Tubular adenoma، carcinoma in situ و حتی Adenocarcinoma invasive را در رت‌های مورد مطالعه تأیید می‌کنند (جدول ۴)؛ همچنین، نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که مصرف غذای حاوی سیاه‌دانه توسط رت‌ها به کاهش چشمگیر تعداد و اندازه تومورها منجر شده است. ترکیب‌های طبیعی از جمله گیاهان دارویی، دارای آثار درمانی قابل توجهی بر روند ایجاد سرطان هستند؛ برای نمونه، مصرف خوراکی (۸ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) از ترکیبی به نام resveratrol (نوعی پلی‌فنل که از انگور استخراج شده است)، روزانه به مدت پانزده هفته، باعث کاهش معنی‌دار تعداد تومورهای القا شده توسط DMH در بافت کولون رت‌ها شده است (۲۷)؛ همچنین مصرف (۵۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) زنجبیل، به صورت خوراکی روزانه به مدت پانزده هفته توسط رت‌ها، باعث کاهش تعداد و اندازه تومورهای القا شده توسط DMH در کولون شده است (۲۸)؛ همچنین، مطالعه‌ای دیگر، روی مخلوطی از سبزیجات نشان می‌دهد که خوراندن مخلوطی از سبزیجات پودر شده شامل اسفناج، کلم بروکلی و جوانه چندین گیاه به همراه کاروتنوئیدهای استخراج شده از روغن هسته خرما به رت‌ها، باعث مهار روند ایجاد سرطان توسط آزوکسی متان در بافت کولون این حیوان‌ها شده است (۲۹).

با توجه به مسیر متابولیسیم DMH، به منظور بررسی دقیق‌تر سازوکارهای احتمالی در کاهش روند سرطان‌زایی بافت کولون، عوامل دخیل در این فرایند «از جمله دخالت سیاه‌دانه در فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسیم مواد شیمیایی سرطان‌زا نظیر سیتوکروم P450 و GST در بافت کبد و همچنین سطح پروتئین بتاکاتنین به‌عنوان یک عامل نسخه‌برداری که بیان آنکوژن‌ها را زیاد می‌کند»، در بافت کولون بررسی شدند.

¹ - Crowell

منجر شده است (۲۸). به منظور بررسی بیشتر و دقیق‌تر سازوکار آثار ضدسرطانی سیاه‌دانه، علاوه بر اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها، در مرحله بعد، یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در ایجاد سرطان کولون توسط DMH، یعنی بتاکانتین بررسی شد. متابولیت فعال DMH به متیلاسیون DNA در سلول‌های اپیتلیال بافت کولون (۴۰) و ایجاد جهش در ژن بتا کانتین منجر می‌شود (۱۷).

پروتئین بتا کانتین در سیتوپلاسم سلول‌های اپیتلیال کولون با (TCF/LEF)، کمپلکس تشکیل می‌دهد و به افزایش بیان برخی از آنکوژن‌ها و ایجاد تومورهای کولون منجر می‌شود (۱۴). ایجاد جهش در ژن بتاکانتین توسط DMH از تخریب بتاکانتین، توسط سیستم پروتئازوم جلوگیری می‌کند. تجمع بتاکانتین در سلول‌های اپیتلیال کولون به افزایش نسخه‌برداری از آنکوژن‌ها و در نتیجه، ایجاد سرطان کولون منجر می‌شود (۱۴).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که تزریق DMH به افزایش شدید میزان پروتئین بتاکانتین در بافت کولون می‌انجامد (شکل ۶) و تغذیه رت‌ها با غذای حاوی سیاه‌دانه در هر دو دز، به کاهش سطح پروتئین بتاکانتین و برگشت آن به سطح کنترل منجر می‌شود؛ این نتایج نشان می‌دهند که تیمار رت‌ها با غذای حاوی سیاه‌دانه، با تعدیل فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم DMH، باعث کاهش بیان ژن بتاکانتین و جلوگیری از تجمع پروتئین بتاکانتین در سلول‌های اپیتلیال بافت کولون می‌شود که در نهایت، کاهش تشکیل ACF در بافت کولون را در پی دارد.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که سیاه‌دانه، دارای آثار ضدسرطانی در مقابل آسیب‌های اولیه سرطان ناشی از DMH در بافت کولون است و بخشی از سازوکار این اثر، از طریق تأثیر روی آنزیم‌های فاز I و II متابولیسم مواد سمی و همچنین سطح پروتئین بتا کانتین است.

افزایش فعالیت این آنزیم در رت‌های تیمار شده با DMH، بر نقش مؤثر آن در سم‌زدایی DMH به‌عنوان یک کارسینوژن دلالت دارد (۳۱)؛ مهار فعالیت این آنزیم توسط سیاه‌دانه باعث کاهش تشکیل متابولیت فعال DMH، یعنی رادیکال فعال متیل دیازونیوم می‌شود؛ از آنجا که این متابولیت فعال از طریق متیلاسیون بازهای گوانین در DNA و ایجاد جهش‌های نقطه‌ای (تبدیل گوانین به آدنین)، آثار سرطان‌زایی خود را اعمال می‌کند (۳۶)، می‌توان نتیجه گرفت که مهار فعالیت سیتوکروم P450 کبدی توسط سیاه‌دانه به احتمال از طریق مهار متیلاسیون بازهای گوانین در DNA و جلوگیری از ایجاد جهش‌های نقطه‌ای، آثار سرطان‌زایی DMH را تعدیل می‌کند (۳۷). با توجه به تأثیر سیاه‌دانه در افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت کبد (به‌عنوان یک آنزیم مهم در فاز II متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها)، حساسیت و تأثیرپذیری آنزیم‌های متابولیزه‌کننده مواد سمی نسبت به سیاه‌دانه بیشتر اثبات می‌شود (نمودار ۴).

کاهش در فعالیت آنزیم GST در بافت کبد رت‌های تیمار شده با DMH، به احتمال به دلیل مصرف آن در سم‌زدایی متابولیت‌های DMH است (۳۸)؛ القای این آنزیم در بافت کبد توسط سیاه‌دانه، نشان‌دهنده افزایش کنژوگه کردن متابولیت‌های DMH با GSH در کبد و کاهش سطح آنهاست. از آنجا که متابولیت فعال DMH (متیل‌دیازونیوم) پس از تشکیل شدن در کبد به کولون منتقل و در آنجا با متیلاسیون و ایجاد جهش در DNA، باعث ایجاد سرطان می‌شود (۳۹)، کاهش متابولیت فعال DMH، به مهار متیلاسیون بازهای گوانین در DNA بافت کولون و در نتیجه، مهار روند ایجاد سرطان کولون توسط DMH منجر می‌شود.

از سوی دیگر، صرف‌نظر از قدرت آنتی‌اکسیدانتی GSH، افزایش میزان گلوکوتانیون سلولی در بافت کبد رت‌هایی که DMH دریافت کرده‌اند، بر نقش مؤثر آن به‌عنوان یک عامل انتخابی رشد سلول‌های سرطانی دلالت داشته که به تکثیر سلول‌های سرطانی

مؤثر سیاه‌دانه، جداسازی و تخلیص شوند و تأثیر این ترکیب‌ها به صورت جداگانه در مهار روند ایجاد سرطان کولون بررسی شود؛ بدین ترتیب با روشن‌تر شدن سازوکار دقیق آثار ضدسرطانی سیاه‌دانه، می‌توان در آینده از این ترکیب و ترکیب‌های گیاهی و طبیعی دیگر در پیشگیری و درمان سرطان استفاده کرد.

البته مطالعاتی بیشتر لازم‌اند تا سازوکار دقیق آثار ضدسرطانی سیاه‌دانه در جلوگیری از روند ایجاد سرطان توسط DMH در بافت کولون، مشخص شود؛ بدین منظور پیشنهاد می‌شود، بیان ژن‌های هدف کمپلکس β -catenin/TCF/LEF یعنی آنکوژن‌های c-myc، c-jun و cyclin D1 پیش و پس از تیمار حیوان‌ها با سیاه‌دانه بررسی شوند؛ همچنین پیشنهاد می‌شود که ترکیب‌های

منابع

- Mahdavinia M, Bishehsari F, Ansari R, Norouzbeigi N, Khaleghinejad A, Hormazdi M, et al. Family history of colorectal cancer in Iran. *BMC Cancer* 2005; (5):112-117.
- Devita V, Hellman JS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 6th ed. New York: Philadelphia; 1997.
- Gottesman M, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP dependent transporters. *Macmillan Magazines Ltd* 2000; (2): 48-58
- Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJV, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *PNAS* 2002; (99): 9433–9438.
- Swan DK, Ford B. Chemoprevention of cancer. Review of the literature. *Oncology Nursing Forum* 1997; (24): 719–727.
- Padhye S, Banerjee S, Ahmad A, Mohammad R, Sarkar FH. From here to eternity—the secret of Pharaohs. Therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. *Cancer Therapy* 2008; 6(b): 495.
- Ali BH and G. Blunden. Pharmacological and Toxicological Propertie of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research* 2003; 17(299): 299-305.
- Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology* 2000; 143(3): 219-26.
- 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007; 40(6): 839-847.
- Rooney S and MF Ryan. Effects of alphahederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer Research* 2005; 25(3B): 2199-204.
- 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007; 40(6): 839-847.
- Tabasi N, Khajavi-Rad A, Mahmoudi M, Bahar-Ara J, Rastin M, Hosainpour-Mashhadi M, et al. The effects of *Nigella sativa* ethanolic extract on proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma ACHN cell line. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 2010; 12(3): 839-847.
- Wang R, Dashwood WM, Bailey GS, Williams DE, Dashwood RH. Tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine plus chlorophyllin or indole-3-carbinol contain transcriptional changes in beta-catenin that are independent of beta-catenin mutation status. *Mutation Research* 2006; 601(1-2): 8-11.
- Seidensticker MJ, Behrens J. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1495(2): 168-82.
- Druckrey H. Production of colonic carcinomas by 1,2-dialkylhydrazines and azoxyalkanes. In: *Burdette WJ, ed. Carcinoma of the colon and antecedent epithelium*. Springfield, IL: Charles C. Thomas 1970; 267-279.
- Manju V, Nalini N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clinica Chimica Acta* 2005; (358): 60–67.
- Wang J, Krill D, Torbenson M, Wang Q, Bisceglia M, Stoner J, et al. Expression of cadherins and catenins in paired tumor and non-neoplastic primary prostate cultures and corresponding prostatectomy specimens. *Urological Research* 2000; 28(5): 308-15.
- Dadkhal A, Fatemi F, Malayeri M, Jahanbani A, Batebi F and Ghorbanpour Z. The chemopreventive effect of *Nigella Sativa* on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 2014; 48: 39-48.
- 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, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007; (40): 839-847.
- Carnesecchi S, Bras-Gonçalves R, Bradaia A, Zeisel M, Gossé F, Poupon MF, et al. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Letters* 2004; 215(1): 53-59.
- Paik SY, Koh KH, Beak SM, Paek SH, Kim JA. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005; 28(5): 802-807.

22. Buke MD, Mayer RT. Ethoxyresorufin: direct fluometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition* 1974; (2): 583-588.
23. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein with bound and non-protein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 1968; (25): 192-205.
24. Dadkhah A, Allameh A, Khalafi H and Ashrafihelan J. Inhibitory effects of dietary caraway essential oils on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis is mediated by liver xenobiotic metabolizing enzymes. *Nutrition and Cancer* 2011; 63(1): 46-54.
25. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, et al. A nti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007; 40(6): 839-847.
26. Kamaleeswari M, Deeptha K, Sengottuvelan M, Nalini N. Effect of dietary caraway (*Carum carvi* L.) on aberrant crypt foci development, fecal steroids, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 290-96.
27. Sengottuvelan M, Senthilkumar R, Nalini N. Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; (1760): 1175-1183.
28. Manju V, Nalini N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clinica Chimica Acta* 2005; (358): 60-67.
29. Rijken PJ, Timmer WG, van de Kooij AJ, van Benschop IM, Wiseman SA, Meijers M, et al. Effect of vegetable and carotenoid consumption on aberrant crypt multiplicity, a surrogate end-point marker for colorectal cancer in azoxymethane-induced rats. *Carcinogenesis* 1999; 20(12): 2267-72.
30. Herzfeld A, Greengard O. The dedifferentiated pattern of enzymes in livers of tumor-bearing rats. *Cancer Research* 1972; 32(9): 1826-32.
31. Rijnkels JM, Alink GM. Effects of a vegetables-fruit mixture on liver and colonic 1,2-dimethylhydrazine-metabolizing enzyme activities in rats fed low- or high-fat diets. *Cancer Letters* 1998; 128(2): 171-175.
32. Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition* 1999; 129(3): 775-778.
33. Devasena T, Rajasekaranb KN, Menona VP. Bis-1,7-(2-Hydroxyphenyl)-Hepta-1,6-Diene-3,5-Dione (A Curcumin Analog) Ameliorates DMH-Induced Hepatic Oxidative Stress during Colon Carcinogenesis. *Pharmacological Research* 2002; 46(1).
34. Aranganathan S, Panneer Selvam J, Sangeetha N, Nalini N. Modulatory efficacy of hesperetin (citrus flavanone) on xenobiotic-metabolizing enzymes during 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Chemico Biological Interactions* 2009; (180): 254-261.
35. Huttunen KM, Mähönen N, Raunio H, Rautio J. Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery. *Current Medicinal Chemistry* 2008; 15(23): 2346-65.
36. Colussi C, Fiumicino S, Giuliani A, Rosini S, Musiani P, Macri C, Potten CS, Crescenzi M, Bignami M. 1,2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in *msh2(-/-)* mice. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93(20): 1534-40.
37. Choudhary G, Hugh Hansen, Ph D. Human health perspective on environmental exposure to Hydrazines: a review. *Chemosphere* 1998; 37(5): 801-843.
38. Devasena T, Menon VP, Rajasekharan KN. Prevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione during colon carcinogenesis. *Pharmacological Reports* 2006; 58(2): 229-35.
39. Fiala ES. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer* 1977; (40): 2436-45.
40. Deeptha K, Kamaleeswari M, Sengottuvelan M, Nalini N. Dose dependent inhibitory effect of dietary caraway on 1,2-dimethylhydrazine induced colonic aberrant crypt foci and bacterial enzyme activity in rats. *Investigation New Drugs* 2006; (24): 479-488.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
22nd Year, No.117
June- July, 2015*

Received: 28/04/2015

Last revised: 07/06/2015

Accepted: 13/06/2015

The effect of *Nigella sativa* on the activity of drugs-metabolizing enzymes and beta catenin level in rat treated with dimethylhydrazine

Abolfazl Dadkhah^{1*}, Mahammadreza Mohammadi Malayeri², Faeze Fatemi³, Alireza Jahanbani⁴, Fateme Torabi⁵, Mohammadhossein Jamali⁶

1. Department of Medicine, Faculty of Medicine, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran.
3. Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran.
4. Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran.
5. Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

* E-mail: dadkhah_bio@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Dimethylhydrazine (DMH) is metabolized to methyl diazonium by cytochrome p450 (CYP 450) in liver that increases some oncogenes expression and via beta catenin mutation and prevention of its destruction.

Materials and Methods: In this study, 48 rats were divided into 6 groups. Colon cancer was induced by DMH injection (20 mg/kg b.w.)(s.c.) once a week for 18 weeks. Also, the effect of food containing *Nigella sativa* powder (2 and 4%) on cancer prevention was evaluated. Then, the liver and colon tissues were removed after 7 months. The activity of glutathione s-transferase (GST) and CYP 450 and the level of reduced glutathione (GSH) in liver and beta-catenin level in colon were measured. Also, the tumor number and size and histological damages were assessed in colon tissue.

Results: The food containing black cumin at both doses reduced tumor number and size. The activity of GST and CYP450 and the level of GSH and beta-catenin were also increased by DMH. Treatment of rats with *Nigella sativa* modulated the level of these factors.

Conclusion: Rats feeding with food containing *Nigella sativa* led to prevention of colon tumor, probably through the influence of detoxifying enzymes activity and beta-catenin level.

Keywords: Colon cancer, *Nigella sativa*, Beta-catenin