مقاله پژوهشي

بررسی اثرات سمیت سلولی و آپوپتوزیس کورکومین و تیموکینون روی رده سلولیHUVEC: یک مطالعه تجربی

مریم غفاری[۱]، زهرا کریمی[۲]، پروین دهقان[۳]، بلال خلیل‌زاده[۴]، جعفر عزتی‌نژاد دولت‌آبادی[۵×]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۱۱/۱۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: کورکومین و تیموکینون دو ماده طبیعی با اثرات جانبی کم و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی و ضد سرطانی قوی و سایر خواص درمانی می‌باشند. هدف از این مطالعه ارزیابی سمیت آن‌ها روی رده سلولی HUVECs به روش MTT و فلوسایتومتری می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، پس از کشت سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای، غلظت‌های ۸۰،۴۰،۲۰،۱۰،۵، ۱۶۰،۳۲۰، میکرو مولار از ماده تیموکینون و کورکومین به سلول‌ها اضافه شده و پس از انکوباسیون در مدت‌زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از روش MTT میزان حیات سلول‌ها بررسی شد. و سپس میزان القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری با کیت انکسین- پروپیدیوم یدید (PI-Annexin) طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. داده‌ها با روش آماری two way-Anova تجزیه‌وتحلیل و معنی‌داری در سطح $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد میزان IC50 در زمان ۲۴ ساعت برای کورکومین ۳۵ میکرومولار و تیموکینون ۱۰۵ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت ۳۲ میکرومولار برای کورکومین و ۹۰ میکرومولار برای تیموکینون بود ($P>0.999$). میزان آپوپتوز برای کورکومین و تیموکینون به ترتیب ۴۰ و ۳۰ درصد تعیین گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشاهده گردید که میزان بقای سلول‌ها به غلظت کورکومین و تیموکینون بستگی داشته است. این دو ترکیب باعث مرگ برنامه‌ریزی سلولی شد، و بقا سلول‌های تیمارشده با تیموکینون بیشتر از کورکومین است.

کلیدواژه‌ها: کورکومین، سمیت سلولی، آپوپتوزیس، تیموکینون، رده سلولی HUVEC

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره اول، ص ۳۹-۳۲، فروردین ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: تبریز، مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۶۳۳۱۱

Email: ezzatij@tbzmed.ac.ir

مقدمه

امروزه سرطان یکی از مهم‌ترین معضلات سلامتی در سراسر دنیا به‌حساب می‌آید که به معنای رشد، تکثیر و گاهی انتشار غیرطبیعی سلول‌های بدن است، سرطان می‌تواند از طریق سموم مختلف کشاورزی، آلاینده‌ها محیطی، داروهای شیمی‌درمانی و حتی افزودنی‌های غذایی القا گردد. به‌طورکلی بسیاری از داروهای شیمیایی و افزودنی‌های های غذایی سبب تغییرهایی در فرایند تقسیم سلولی شده و اختلال در تکثیر و تمایز سلول‌های سالم می‌شود. ایراد اساسی داروهای شیمی‌درمانی و افزودنی‌های غذایی سنتتیک این است که به سلول‌های سالم فرد صدمه می‌زند بنابراین دانشمندان سعی دارند تا استفاده از زیست فعال‌های طبیعی با اثرات سمی پایین را جایگزین این داروها شیمیایی و افزودنی‌های سنتتیک کنند.

زردچوبه از خانواده زنجبیل با نام علمی Curcuma longa و با نام انگلیسی Turmeric شناخته می‌شود زردچوبه گیاهی است علفی ارتفاع یک تا یک و نیم متر و دارای ریزوم متورمی است که

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[۲] دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[۳] دانشیار علوم تغذیه، مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[۴] استادیار مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[۵] استادیار مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-10]

از آن چندین ساقه هوایی خارج می‌شود قسمت مورداستفاده غذایی و دارویی این گیاه ریزوم‌های خشک شده است (۱). زردچوبه گیاه بومی نواحی گرم آسیا، نظیر کشورهای هندوستان، پاکستان اندونزی، جنوب چین، و بومی آفریقا و آمریکای جنوبی است و در ایران رویش ندارد (۱، ۲). کورکومین و روغن فرار موجود در زردچوبه دارای اثرات درمانی گسترده ازجمله درمان بیماری‌های ریوی، بیماری‌های کلیوی، قلبی، عصبی همچنین کورکومین یک ترکیب شدیداً ضدالتهابی (۲)، همچنین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان و میکروبی می‌باشد(۳، ۴). مطالعات مختلف بیانگر عدم خاصیت سمیت ژنی و جهش‌زایی این ماده می‌باشند (۵). بنابراین این ماده در صنعت غذا به‌عنوان یک افزودنی رنگ دهنده مورداستفاده قرار گرفته است.

سیاه‌دانه گیاهی علفی با نام علمی Nigella sativa L. از خانواده رانونکولاسه آ و به‌طور طبیعی در بخش‌های مختلفی از کشور وجود دارد. این گیاه حداکثر به میزان ۶۰ سانتی‌متر رشد می‌کند و دارای گل‌های سفید یا آبی کمرنگ با برگ‌های منقسم می‌باشد، میوه این گیاه دارای کپسول متورم است که از ۷-۳ فولیکول تشکیل‌شده و هر یک حاوی دانه‌های بسیاری است. سیاه‌دانه در زبان انگلیسی Black Seed و یا Black Cumin و در زبان فارسی شونیز (Shoniz) و یا سیاه‌دانه نامیده می‌شود (۶). همچنین این گیاه بومی آسیای غربی است و بخصوص کشورهای مدیترانه شرقی به‌طور گسترده کشت می‌شود. سیاه‌دانه یکی گیاهان شناخته شده‌ای هستند که از علاوه بر مصرف دارویی مصرف غذایی نیز دارد، که نسبت به مواد سنتتیک سمیت بسیار پایینی دارد (۷). ازنظر فارماکولوژی اجزای فعال دانه‌های سیاه‌دانه حاوی تیموکینون (Thymoqinone)، دی تیموکینون، تیموهیدروکینون و تیمول می‌باشند(۹،۸). تیموکینون و روغن فرار سیاه‌دانه برای درمان بیماری‌هایی مثل آسم، فشارخون، دیابت، التهاب، سرفه، برونشیت، سردرد، اگزما، تب، سرگیجه و آنفولانزا نیز مصرف داشته است. دانه یا روغن آن به‌عنوان داروی ضدنفخ، ادرارآور، شیرآور و ضدانگل استفاده می‌شود همچنین تیموکینون حاوی خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۱۰، ۱۱).

ازآنجایی‌که مواد مختلف تأثیر خود را با اثر روی تکثیر سلول‌ها نشان می‌دهند، به‌منظور استفاده از این دو ماده به‌عنوان افزودنی غذایی و مواد دارویی در قدم اول بایستی میزان دوز مؤثر و سمیت آن‌ها را در سلول‌های سالم انسان به دست آورد. بدین منظور میزان IC50 که میزان دوز لازم برای مهار رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها است، تعیین می‌شود. سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری میزان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های درمان شده ارزیابی می‌گردد. با توجه به موارد ذکرشده هدف از این مطالعه تعیین دوز سایتوتوکسیسیتی و درصد آپوپتوز مورداستفاده کورکومین و تیموکینون در سلول‌های سالم بند ناف انسان (HUVEC) می‌باشد.

مواد و روش کار

مواد:

سلول‌های HUVEC از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد. محیط کش RPMI-۱۶۴۰ و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Gibco تهیه گردد. کورکومین، تیموکینون، آنتی‌بیوتیک پنیسیلین، استرپتومایسین و تریپسین-EDTA از کمپانی سیگما خریداری شد.

کشت سلولی:

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. سلول‌ها در محیط حاوی RPMI-1640غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، 1 درصد پنیسیلین و استرپتومایسین در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند، توسط تریپسین- EDTA از ته فلاسک جداشده و در دور 1300 rpm به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک سی‌سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده‌بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان به لو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده‌بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست استفاده شد.

ارزیابی سمیت سلولی توسط روش MTT:

برای تعیین سمیت و سنجش میزان تأثیر داروهای فوق بر رشد و تکثیر سلول‌های HUVEC از روش MTT استفاده گردید. روش MTT یک روش ارزیابی رنگ سنجی از قابلیت زیستن سلول‌هاست و اساس آن احیای نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر خواهد بود. چون سلول‌های مرده توانایی تبدیل MTT به فورمازان را از دست می‌دهند، بنابراین، ایجاد رنگ ارغوانی به‌عنوان یک نشانگر مناسب برای تعداد سلول‌های زنده به شمار می‌رود (۱۲).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-10]

جهت انجام این تست، ابتدا سلول‌ها از کف فلاسک با اضافه کردن آنزیم تریپسین جداشده و سپس جهت یکنواخت نمودن تعداد سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه شمارش سلولی صورت گرفت. رده سلولی HUVEC با دانسیته سلولی $۱۰^{۳}$ × ۱۰ cell/well به داخل هر چاهک میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انتقال و تحت شرایط رشد سلولی (۹۵درصد رطوبت، ۵درصد CO_2 و دمای $۳۷^{\circ C}$ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد تا سلول‌های منتقل‌شده به سطح چاهک‌ها بچسبند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت‌های ۸۰،۴۰،۲۰،۱۰،۵، ۱۶۰،۳۲۰ میکرومولار تیموکینون و کوروکومین به مدت‌زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، تحت شرایط رشد سلولی (۹۵درصد رطوبت، ۵درصد CO_2 و دمای $۳۷^{\circ C}$ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شدند. در ادامه، هر یک از چاهک‌ها با ۵۰ میکرولیتر محلول MTT جایگزین شدند و میکروپلیت‌ها به مدت تا ۴-۳ ساعت در تاریکی انکوبه شدند. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون، محیط سلول‌ها به‌طور کامل تخلیه‌شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید اضافه شده و بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای $۳۷^{\circ C}$ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری میکروپلیت‌ها در طول‌موج ۵۷۰nm با استفاده از الایزا ریدر (BioTek Instruments Inc, Vermont, USA) قرائت شد. از روی نمودار ستونی، درصد زنده‌مانی سلول مشخص شد و سپس از روی نمودار رگرسیون خطی IC50 تعیین شد تا در آزمایشات ارزیابی آپوپتوزیس استفاده شود. در تست MTT از سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۲).

تعیین میزان آپوپتوزیس:

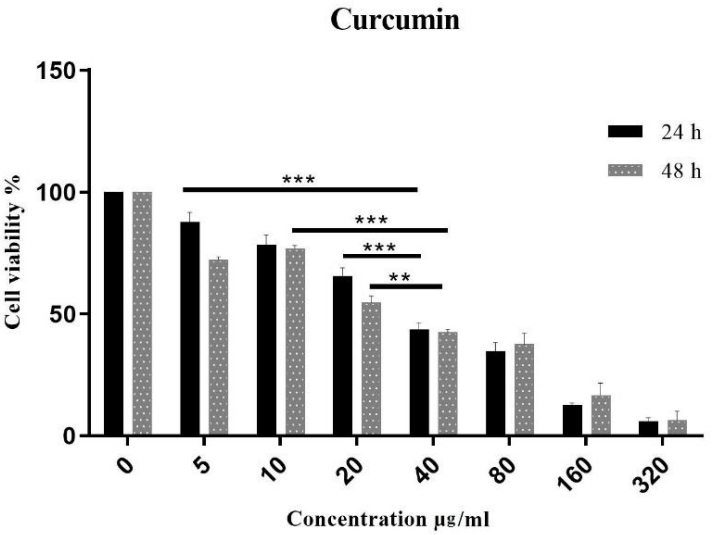
آنکسین‌ها (Annexin) پروتئین‌های سیتوزولی محلول در آب هستند که در یک مسیر وابسته به کلسیم به فسفولیپیدها متصل می‌شوند. از این خاصیت برای تشخیص فسفاتیدیل سرین به‌عنوان یک فسفولیپید در غشای سلول‌های آپوپتوتیک که در سلول‌های سالم در غشای داخلی قرار گرفته‌اند، استفاده می‌شود (۱۳، ۱۴). برای انجام این تست ابتدا سلول‌های HUVEC از کف فلاسک با اضافه کردن آنزیم تریپسین جداشده و سلول‌ها به پلیت‌های ۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت کامل RPMI-1640اضافه شد و تحت شرایط رشد سلولی (۹۵درصد رطوبت، ۵درصد CO_2 و دمای $۳۷^{\circ C}$ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا سلول‌های منتقل‌شده به سطح پلیت‌ها بچسبند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، پلیت‌های ۶ خانه‌ای حاوی سلول‌های HUVEC با میزان غلظت‌های تعیین‌شده (IC0) در MTT برای افزودنی‌های موردمطالعه، تیمار شده و به مدت‌زمان ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیدند. بعد از انکوباسیون سلول‌ها توسط تریپسن جدا نموده و با FBS خنثی شد و بعد از آن سلول‌ها در دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند سپس به سلول‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد بافر باندینگ اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰rpm در دمای سانتریفوژ شدند. پس از حذف مایع رویی ۵ میکرولیتر محلول annexin V-FITC اضافه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند .رنگ Annexin به فسفاتیدیل سرین‌های موجود در غشای سلول آپوپتوز یافته چسبیده و آنها را نشان دار می‌نماید. و در پایان پس از سانتریفیوژ و حذف مایع رویی ۵ میکرولیتر محلول PI(iodide Propidum) اضافه گردید. PIدر سلول‌های نکروز شده به DNA هسته متصل شده و تعداد سلول‌های نکروز شده را نشان داد. در مرحله آخر سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (San Jose, USA) ارزیابی شدند در این آزمون محیط کشت سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

یافته‌ها

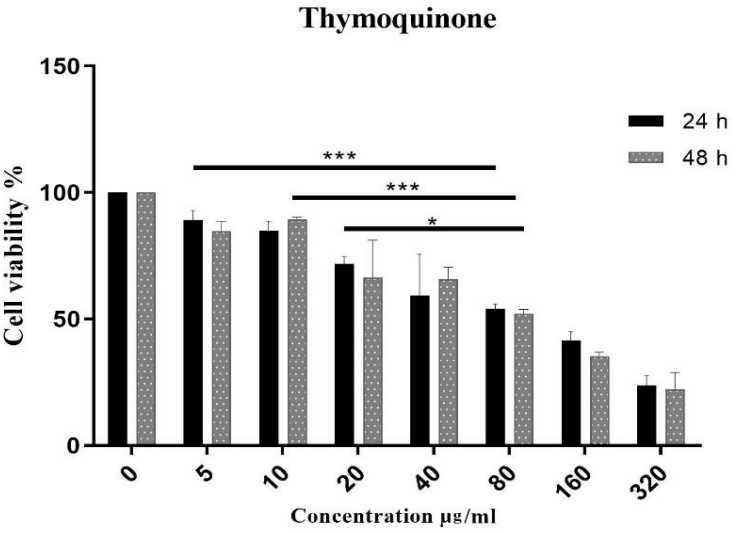
در این مطالعه برای ارزیابی و مقایسه داده‌ها از نرم افزار Graph Pad Prismویرایش 7 استفاده گردید و سطح معنی‌داری برای آزمون‌های آماری 0/05 درنظر گرفته شد. نمودار ۱ برای کورکومین نشان می‌دهد که درصد بقا برای کورکومین در مقایسه با گروه کنترل، وابسته به غلظت بوده است، به‌طوری که با افزایش غلظت، اثر سمیت کورکومین بر سلول‌ها افزایش یافت. اما این کاهش، ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری را برای دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان نداد ($p > 0/05$). مقدار IC50 کوکومین برای تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب ۳۲ و ۳۵($P>0.999$) میکرومولار تعیین گردید.

به علاوه نمودار ۲ درصد زنده‌مانی تیموکینون در مقایسه با گروه کنترل، را نشان می‌دهد که مقدار IC50 تیموکینون برای تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب ۹۰ و ۱۰۵ ($P>0.999$) میکرومولار تعیین گردید. آزمون آماری Anova Two- Way نشان داد که با افزایش غلظت بر کاهش درصد زنده‌مانی معنی‌دار بوده است ($p < 0/05$). این درحالی بود که با افزایش زمان سمیت سلولی ناشی تیموکینون از لحاظ آماری معنی دار نبود ($p> ۰/۰۵$).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-10]



نمودار (۱): درصد زنده‌مانی سلول‌های HUVEC در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف کورکومین



.**نمودار (۲):** درصد زنده‌مانی سلول‌های HUVEC در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف تیموکینون

تعیین میزان آپوپتوز سلولی:

اندازه گیری آپوپتوز با رنگ آمیزی دوگانه Annexin-V/PI با دستگاه فلوسایتومتری یکی از تستهای مورد کاربرد برای ارزیابی ژنوتوکسیتی سلول می‌باشد که جهت ارزیابی این پارامتر از مقادیر IC۵۰ تعیین شده در MTT استفاده می‌شود. در این راستا مقادیر IC۵۰ برای کورکومین ۳۲ میکرومولار و تیموکینون ۹۰ میکرومولار در زمان اختصاصی ۴۸ ساعت تعیین گردید.

نتایج ارائه شده در فلوسایتومتری شامل درصد جمعیت سلول‌های زنده، نکروزه، آپوپتوزیس (مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه) برای سلول‌های تیمار شده با کورکومین و تیموکینون می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان می‌دهد که کورکومین در غلظت ۳۵ میکرومولار باعث ۴۰ درصد آپوپتوز اولیه و ۰/۸۱ درصد نکروزه سلول‌های HUVECs شده است. همچنین سلول‌های تیمار شده با غظت ۹۰ میکرومولار تیموکینون نیز در مدت ۴۸ ساعت دارای ۳۱ درصد آپوپتوز اولیه و ۱/۶۴ درصد نکروز است. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان می‌دهد کوکومین خاصیت آپوپتوزی بیشتری نسبت به تیموکینون روی سلول‌های نرمال HUVECs دارد.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-10]

جدول (۱): نتایج فلوسایتومتری بعد از تیمار سلول‌های HUVEC با کوکومین و تیموکینون در مقایسه با سلول تیمار نشده بعد از ۴۸ ساعت.

سلول‌های تیمار شده و کنترل	سلول‌های زنده (%)	نکروز (%)	آپوپتوز اولیه (%)	آپوپتوز ثانویه (%)
کنترل	۹۹/۷۶	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۱۵
تیموکینون	۶۶/۵۴	۱/۶۴	۳۰/۰۴	۱/۷۴
کوکومین	۵۵/۳۳	۱/۸۱	۴۰/۵۲	۱/۱۵

بحث و نتیجه گیری

امروزه استفاده از داروهای شیمی‌درمانی و افزودنی‌های سنتتیک باعث اختلال در عملکرد سلول‌های سالم شده است. مطالعات انجام شده در زمینه سمیت سلولی نشان داده است که این مواد سنتتیک که باعث ایجاد آپوپتوز شدید و شکستگی DNA می‌شود (۱۲). با توجه به افزایش نگرانی‌ها در مورد ایمنی داروهای شیمیایی و افزودنی‌ها، تقاضا برای استفاده از زیست فعال‌ها در سال‌های اخیر بیشترین توجه را به خود جلب کرده است. جستجوی ترکیبات بیولوژیک طبیعی منجر به معرفی تیموکینون و کورکومین به‌عنوان یک ترکیب زیست فعال برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی گردید. هدف از مطالعه این بررسی اثرات سمیت و میزان آپوپتوز سلولی ناشی از کورکومین و تیموکینون در سلول‌های HUVEC می‌باشد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که درصد زنده‌مانی سلول‌ها در گروه کنترل بیشترین میزان را داشته است که ما این میزان را صد درصد در نظر گرفتیم اما پس از مدت‌زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تماس با کورکومین، درصد زندمانی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته و این کاهش تنها وابسته به غلظت بود و زمان تأثیر ز لحاظ آماری بر میزان حیات سلول‌ها نداشت. در مورد تیموکینون نیز، کاهش درصد زندمانی وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت درصد زندمانی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. میزان IC50 کورکومین در زمان ۲۴ ساعت ۴۰ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت ۳۰ میکرومولار بود، در حالی که در مورد تیموکینون میزان IC50 در زمان ۲۴ ساعت ۱۰۵ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت ۹۰ میکرومولار بود. در ادامه برای تشخیص نکروز و آپوپتوز به‌منظور ارائه شرح کلی از سمیت انتخابی یک ماده شیمیایی از رنگ آمیزی دوگانه(Annexin V / PI) استفاده شد. آپوپتوز نوعی از مرگ در سلول‌های موجودات است که در آن سلول‌های تعیین شده‌ای با دریافت سیگنال‌های ایجاد کننده مرگ محکوم به از بین رفتن هستند. این سلول‌ها به محض دریافت سیگنال (از درون یا بیرون از سلول) در خود شاهد یک سری از اتفاقات آبشار گونه از واکنش مولکول‌ها هستند و در نتیجه مرگ را برای سلول به دنبال خواهد داشت. آنالیز فلوسایتومتری نشان داد ۴۰/۶۷ درصد از سلول‌ها در اثر تیمار با کوکومین دچار آپوپتوز سلول شده‌اند در حالی که آپوپتوز سلول‌های تیمار شده با تیموکینون ۸۲/ ۳۱ درصد بود. و هر چند که درصد بسیار کمی هم از سلول‌ها دچار نکروز شدند ولی این میزان نسبت به درصد سلول‌های آپوپتوز شده بسیار ناچیز بود. یافته‌ها بیانگر این مطلب است که هر دو ماده در غلظت بالا می‌توانند سلول‌های سالم را به سوی آپوپتوز پیش ببرد و از تکثیر آنها جلوگیری کند.

Haron و همکارانش با بررسی تأثیر تیموکینون روی سلول‌های سرطانی کبد انسان نشان دادند که تیموکینون به‌طور معنی‌داری باعث کاهش تکثیر و حیات سلول‌ها شده است و میزان IC50 آن برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۶/۷، ۱۳/۱ و ۱۱/۱ میکرومولار و همچنین میزان آپوپتوز برای زمان‌های ذکر شده به ترتیب ۱۲/۹، ۱۳/۱ و ۱۳/۵ گزارش کردند (۱۵). Kunwar و همکارانش در سال ۲۰۰۷ تأثیر سمیت کورکومین روی رده سلولی EL4 و MCF7 به مدت ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند که با افزایش غلظت کوکومین میزان سمیت افزایش می‌یابد و سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های فیبروبلاستی سالم حساسیت بالاتری نسبت به سمیت کورکومین دارند (۱۶).

Mendonca و همکارانش در سال ۲۰۰۹ تأثیر کورکومین را روی رده سلولی PC12 ارزیابی و گزارش کردند که با افزایش غلظت با میزان بقای سلول‌ها رابطه عکس دارد (۱۷). تیان یو لی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند کورکومین میزان بقای سلول‌های سرطان مثانه را با افزایش غلظت و زمان کاهش می‌دهد (۱۸). منصورآبادی و همکاران در سال ۲۰۱۷ میزان IC50 کورکومین را روی سلول‌های سرطان سینه در زمان‌های اختصاصی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۱ و ۱۴/۸ گزارش کردند (۱۹). در پژوهشی توسط دستجردی و همکاران در سال ۲۰۱۶ میزانIC50، تیموکینون روی سلول MCF7، در زمان ۲۴ ساعت ۲۵ میکرو مولار گزارش شد (۲۰). همچنین میزان مرگ برنامه‌ریزی شده

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-10]

برای زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۳۰ و ۴۰ درصد گزارش کردند. طبق تحقیق انجام شده توسط Zhang و همکاران (۲۱) کوکومین در دوز ۱۸ میکرو مولار باعث مرگ ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی ریه انسان شد. نتایج بیانگر این است که با افزایش غلظت کوکومین بقا سلول کاهش می یابد، و همچنین و میزان آپوپتوز ناشی از آن ۵۹/۱ درصد گزارش شد. در این مطالعه ما سمیت و مرگ برنامه‌ریزی شده این دو دارو را روی رده سلولی HUVEC به روش MTT و رنگ آمیزی دوگانه (Annexin V /PI) بررسی کردیم. میزان IC50 برای هر کدام تعیین گشت. نتایج نهایی مطالعه حاضر نشان داد که درصد بقا وابسته به غلظت بوده در حالی که میزان بقا سلول‌ها در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معناداری نشان نداد. همچنین سلول‌های تیمارشده با کوکومین و تیموکینون باعث افزایش مرگ برنامه‌ریزی سلول‌های HUVEC شد در پایان مطالعه ما نشان داد میزان سمیت سلولی و مرگ برنامه‌ریزی سلول‌های تیمار شده با کوکومین بالاتر از تیموکینون می‌باشد. و نیز لازم به ذکر است که محدودیت مطالعه حاضر نبود امکانات کافی برای کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی و بعد از آن تست بر روی کیس های انسانی به دلیل کافی نبودن منابع مالی بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از دانشگاه علوم پزشکی تبریز بابت حمایت مالی طرح شماره ۵۸۹۴۵ با کد اخلاق IR.TBZMED.REC.1396.766 اعلام می‌دارند.

References:

1. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti F, Torti S. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. Cell Mol Life Sci2008;65 (11):1631- 52.
2. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Int J Biochem Cell Biol2009;41 (1):40- 59 .
3. Sharma O. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. Biochem Pharmacol1976;25 (15):1811.
4. Negi P, Jayaprakasha G, Jagan Mohan Rao L, Sakariah K. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. J Agric Food Chem1999;47 (10):4297- 300.
5. Sharma R, Gescher A, Steward W. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer2005;41 (13):1955- 68.
6. Fallah Huseini H, Mohtashami R, Sadeqi Z, Saidi Y, Fallah Huseini A. A review on pharmacological effects of nigella sativa l. Seeds. Journal of medicinal plants. 2011 Jan 1;10(38):1–18.
7. Ali B, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res2003;17 (4):299- 305 .
8. Randhawa MA, Alghamdi MS. Anticancer activity of Nigella sativa (black seed)—a review. AmJ Chin Med2011;39 (06):1075- 91.
9. Karimi Z, Alizadeh AM, Dolatabadi JEN, Dehghan P. Nigella sativa and its Derivatives as Food Toxicity Protectant Agents. Adv Pharm Bull 2019; 9(1): 22.
10. Karimi Z, Ghaffari M, Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Dehghan P. The protective effect of thymoquinone on tert-butylhydroquinone induced cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells. Toxicol Res 2019; 8(6): 1050-6.
11. Forouzanfar F, Bazzaz BSF, Hosseinzadeh H. Black cumin (Nigella sativa) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. Iran J Basic Med Sci2014;17 (12):929.
12. Eskandani M, Hamishehkar H, Dolatabadi JEN. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. Food Chem2014;153:315- 20 .
13. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. J Vis Exp 2011 ;24(50):e2597.
14. Nazarparvar-Noshadi M, Dolatabadi JE, Rasoulzadeh Y, Mohammadian Y, Shanehbandi D. Apoptosis and DNA damage induced by silica nanoparticles and

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-10]

formaldehyde in human lung epithelial cells. Environ Sci Pollut Res 2020; 27(15): 18592-601.

15. Haron AS, Alwi S, Sakinah S, Saiful Yazan L, Abd Razak R, Ong YS, et al. Cytotoxic Effect of Thymoquinone-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (TQ-NLC) on Liver Cancer Cell Integrated with Hepatitis B Genome, Hep3B. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine2018;2018.
16. Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R, Priyadarsini K .Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. Biochim Biophys Acta2008;1780 (4):673- 9.
17. Mendonça LM, dos Santos GC, Antonucci GA, dos Santos AC, Bianchi MdLP, Antunes LMG. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. MutatRes2009;675 (1-2):29- 34.
18. Liu T-Y, Tan Z-J, Jiang L, Gu J-F, Wu X-S, Cao Y, et al. Curcumin induces apoptosis in gallbladder carcinoma cell line GBC-SD cells. Cancer Cell Int2013;13 (1):64.
19. Mansourabadi A, Hematti M, Moradi A, Maghsoudi A. Evaluation of Curcumin and Quercetin Toxicity Effects on 4T1 Murine Breast Cancer Cell Line by MTT Method. Iran South Med J 2017; 20 (1) :1-8.
20. Dastjerdi MN, Mehdiabady EM, Iranpour FG, Bahramian H. Effect of thymoquinone on P53 gene expression and consequence apoptosis in breast cancer cell line. Int J Prev Med 2016; 7:66.
21. Naidu KA, Tang JL, Naidu KA, Prockop LD, Nicosia SV, Coppola D. Antiproliferative and apoptotic effect of ascorbyl stearate in human glioblastoma multiforme cells: modulation of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) expression. J Neurooncol2001;54 (1):15- 22.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-10]

Original Article

CYTOTOXICITY AND APOPTOSIS EFFECTS OF CURCUMIN AND THYMOQUINONE ON HUVEC CELLS: AN EXPERIMENTAL STUDY

*Maryam Ghaffari[1], Zahra Karimi[2], Parvin Dehghan[3], Balal Khalilzadeh[4], Jafar Ezzati Nazhad Dolatabadi[5]**

Received: 09 October, 2020; Accepted: 26 January, 2021

Abstract

Background & Aims: Curcumin and thymoquinone are common herbal medicines with low side effects and potent antioxidant, anti-diabetic, and anti-cancer activity. This investigation aimed to evaluate toxicity of curcumin and thymoquinone on HUVECS cell lines via MTT and flow cytometry assays.

Materials & Methods: HUVEC cells were cultured in RPMI-1640 medium under standard culture conditions (5% CO2 and 95% humidified air at 37°C). Curcumin and thymoquinone were used at concentrations of 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 µM and incubated for 24 and 48 hours, then cell viability was assessed using MTT assay. Cell apoptosis was measured by flow cytometry via Annexin V-FITC and propidium iodide kit. Data were analyzed using two-way ANOVA and $p < 0.05$ was considered significant.

Results: The results of this study showed that IC50 for curcumin and thymoquinone was 35µM and 105 µM at 24 h, and 32 µM and 90 µM at 48 h, respectively ($p > 0.999$). Apoptosis rates for curcumin and thymoquinone were 40% and 30%, respectively.

Conclusion: In this study, we observed that cell viability depended on the concentration of curcumin and thymoquinone. Both compounds induced apoptosis and also the cell viability of HUVEC upon treatment with thymoquinone is more than that of curcumin.

Keywords: Curcumin, Thymoquinone, Cytotoxicity, Apoptosis, HUVEC Cell Line

Address: Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Tel: +98 41 33363311
Email: ezzatij@tbzmed.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(1): 39 ISSN: 2717-008X

[1] MSc of Food Health and Safety, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2] MSc of Biochemistry, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Associate Professor of Nutrition Sciences, Nutrition Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4] Assistant Professor of Applied Pharmaceutical Sciences Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[5] Assistant Professor of Applied Pharmaceutical Sciences Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-10]