# اثرات ضد سرطانی عصاره های انگلی *Toxoplasma gondii* و *Leishmania Major* بر رده سلولی سلولی سرطانی مقاوم (A۲۷۸۰-CP) و حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین

آمنه الیکایی[۱]، حسین وزینی[۲*]، فاطمه جوانی جونی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۳
تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/٤/۲۷

چکیده

***سرطان یکی از معضلات جامعه بشری است که تهدید کننده سلامت انسان محسوب می شود. از آنجایی که داروهای ضد سرطان دارای عوارض جانبی متعددی می باشند شناسایی فرآیندهای بیولوژیک و آنتی ژنهای تک یاختگان منجر به معرفی کاندیدهای مناسب می شود. در این مطالعه تجربی تاثیر داروی سیس پلاتین و عصاره های انگلToxoplasma gondii و Leishmania Major بر رده سلولی سرطانی مقاوم (A۲۷۸۰-CP) و حساس (A۲۷۸۰) به سیس پلاتین به صورت منفرد و توأم مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی میزان حیات سلولها از تست MTT وجهت بررسی میزان تکثیرسلول وشمارش سلول‌ها از رنگ آمیزی تری پانبلواستفاده شد. داده ها توسط نرم افزار SPSS و Graphpad prismمحاسبه گردید. میزان تکثیر سلولی در دو گروه آزمایشی نسبت به گروه کنترل با کاهش معناداری همراه بوده است. بیشترین میزان کاهش تکثیر و سلولهای مرده***

۱.استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
*۲. استادیار، گروه پرستاری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران
(نویسنده مسئول:hossein_vazini@yahoo.com)
۳. استادیار، مدعوگروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

***در دو گروه آزمایشی مربوط به گروه تیمار شده با عصاره ی انگل لیشمانیا ماژور توام با داروی سیس پلاتین مشاهده گردید. عصاره های انگلی توکسوپلاسما گوندی و لیشمانیا ماژوربه دلیل دارا بودن کمپلکسی ازآنتی ژن های دفعی/ترشحی، می توانند اثرات کشندگی قابل توجهی بر هر دو رده سلولی سرطانی دارا باشند.***

***واژه های کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، سرطان گردن رحم، سیسپلاتین، لیشمانیا ماژور، A۲۷۸۰-CP، A۲۷۸۰***

**مقدمه**

سرطان گردن رحم (سرویکس)درپی رشد نامنظم و فزاینده ی تکثیر سلول های سرطانی در ناحیه گردن رحم نشأت می گیرد(Bae et al., 2005).این سرطان دومین سرطان رایج در زنان می باشد. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، سالانه حدود ۵۰۰ هزار زن به این بیماری مبتلا می شوند و حدود ۳۰۰ هزار نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می دهند (Jemal et al., 2011). از جمله علل این بیماری، ویروس پاپیلومای انسانی(HPV) می باشد. این ویروس با دارا بودن چندین سروتایپ، بیش از ۹۹ % درصد سرطانهای رحم را به خود اختصاص می‌دهد. این ویروس DNA دار با کد کردن گروهی از پروتئینهای ساختمانی و غیر ساختمانی سبب مهار عملکرد طبیعی مرگ برنامه ریزی سلول وچرخه تکثیر سلول می گردند. از این رو، یک سلول بالقوه سرطانی ایجاد می گردد(Yugawa& Kiyono 2009). جراحی، پرتو درمانی و شیمی درمانی از جمله روشهای درمان این سرطان می باشد. اگرچه این روشها در برابر شماری از سرطانها موثر می باشند، اما سبب از بین رفتن سلولهای طبیعی و آسیب آنها می گردند (Das Ghosh et al., 2012). سیس پلاتین، دارویی ضد سرطان در درمان شماری از سرطان ها از جمله؛ مثانه، لنفوم، سرطان رحم، ریه و ... می باشد(Dasari & Tchounwou 2014; Du Bois et al., 2003; Bertolini et al., 2009). این دارو که به صورت انفوزیون کوتاه مدت به کار می رود پس از ورود به سلول، دچار آبپوشی شده و با جایگزینی مولکولهای آب به جای گروههای کلر، وارد هسته می شود و با اتصال به صورت Intrastrand به ناحیه ی باز گوانین یک رشته DNA سبب مهار تکثیر سلول می گردد(Dasari & Tchounwou 2014; Baruah et al., 2002; Eastman 1999; Siddik 2003; Fuertes et al.,2003). اگر چه مصرف این دارومفید می باشد، اما دارای عوارض جانبی همچون؛ سمیت کلیوی، سمیت عصبی، سمیت شنوایی، آنمی همولیتیک و تهوع و استفراغ می باشد (Yao et al., 2007; Milosavljevic et al., 2010; Li et al., 2004; Salama 2009; de Wit et al., 2004.) از طرفی به دلیل مقاومت

دارویی ایجاد شده در زمان مصرف (مقاومت در زمان ورود به سلول و مقاومت بعد از ورود به سلول) استفاده از آن بامحدودیت همراه است(Pabla et al., 2009; Rabik& Dolan, 2007; Beretta et al., 2004). از این رو، یافتن دارویی که سمیت وعوارض کمتری د اشته باشد امری ضروری است. در دهه های اخیر تحقیقات در حوزه های مربوط به سرطان گسترش یافته است. روشهای بیولوژیک از جمله روشهای نویدبخش و سالم در حوزه درمان سرطان به شمار می روند که امروزه تا حد زیادی مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته شده است. پژوهشهای اخیر نشان داده اند آنتیژن برخی انگلها دارای قابلیت ضد سرطانی می باشد(Surowiak et al., 2007; Yousofi et al., 2012; Darani et al., 2009).توکسوپلاسما گوندی و لیشمانیا ماژور ازشایع ترین عفونت های انگلی ناشی از تک یاختگان درجهان می باشند(Lam, 1985; Montoya et al., 2010). این تک یاختگان، همانندسایر موجودات تک سلولی حاوی کمپلکسی ازآنتی ژن های دفعی/ترشحی هستند که قابلیت تحریک سیستم ایمنی، آپپتوز و مهار تکثیر سلول را دارا می باشند (Herwldt, 1999; Magkos et al., 2008 Banerjee & Maulik, 2002; Jeon et al., 2009; Yoon, 2006; Nakhostin-Roohi et al.,2008;). از طرفی مطالعات انجام شده برروی مواد دفعی/ترشحی انگلهای نشان داد ه است که آنتی ژن های دفعی/ترشحی به شدت ایمونوژن می باشند وسبب فعال نمودن سلول Tغالب CD4+ و ترشح سایتوکاینهایی چون؛ اینترلوکین ها(IL)، اینترفرون گاما(IFN-γ) و ... که سبب بروزاعمالی نظیر؛ فعال نمودن ماکروفاژها، کنترل تولید آنتی با د ی در سلولهای B و تحریک ایمنی سلولی و هومورال می گردند (Reiner&Laksley, 1995; Campos, 2005). در زمینه ارتباط انگل با سرطان مطالعات اندکی صورت گرفته است به گونه ای که شناسایی فرآیند های زیستی سایر آنتی ژن های تک یاختگان می تواند به عنوان کاندید مناسبی علیه سلولهای سرطانی در آیند ه باشند و راهگشایی جهت تولید واکسنهای زیستی کم عارضه باشد(Herwldt, 1999; Magkos et al.,2008; Banerjee & Maulik, 2002; Jeon et l., 2009; Yoon, 2006; Nakhostin-Roohi et al., 2008). باتوجه به مطالعات قبلی انجام شد ه در تعیین آنتی ژن های موجود در این تک یاختگان و مشابهت زیاد آنتی ژن های دفعی/ترشحی با آنتی ژن های سلولهای سرطانی وعدم انجام پژوهشی دررابطه با اثرات عصاره این انگلها بر سرطان، هدف از این مطالعه بهینه سازی اثر داروی ضد سرطانی سیس پلاتین در ترکیب با عصاره ی انگلهای توکسوپلاسماگوند ی و لیشمانیا ماژور در زمان ۲٤ ساعت بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A2780) و حساس (A2780) به سیس پلاتین می باشد.

**مواد و روشها**

**روش بررسی**

این مطالعه تجربی بر روی ۱۲گروه شامل: تاثیر عصاره ی انگل توکسوپلاسما گوندی بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A2780) به سیس پلاتین، تاثیر عصاره ی انگل توکسوپلاسماگوندی برررده

سلولی سرطانی حساس (A2780) به سیس پلاتین، تاثیر عصاره ی انگل لیشمانیا برررده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A2780) به سیس پلاتین، تاثیر عصاره ی انگل لیشمانیا ماژور بر رده‌سلولی سرطانی حساس (A2780) به سیس پلاتین، تاثیر داروی سیس پلاتین بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A2780) به سیس پلاتین، تاثیرداروی سیس پلاتین بر(A2780)، تاثیر عصاره ی انگل توکسوپلاسما گوندی توام با عصاره ی انگل لیشمانیا ماژور بر رده سلولی سرطانی حساس (A2780) به سیس پلاتین، تاثیر عصاره ی انگل توکسوپلاسما گوندی توام با عصاره ی انگل لیشمانیاماژوربر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A2780) به سیس پلاتین، تاثیر داروی سیس پلاتین توام با عصاره ی انگل توکسوپلاسما بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A2780) به سیس پلاتین، تاثیر داروی سیس پلاتین توام با عصاره ی انگل توکسوپلاسماگوندی بر رده سلولی سرطانی حساس (A2780) به سیس پلاتین، تاثیر داروی سیس پلاتین توام با عصاره ی انگل لیشمانیا ماژور بر رده سلولی سرطانی حساس (A2780) به سیس پلاتین، تاثیر داروی سیس پلاتین توام با عصاره ی انگل لیشمانیا ماژور بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A2780) به سیس پلاتین مورد ارزیابی قرار گرفت.

**تهیه انگل و عصاره گیری**

ذخیره توکسوپلاسما گوندی سوش RH و لیشمانیا ماژور از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. لیشمانیا ماژوربصورت پاساژهای متوالی درمحیط کشتRPMI ۱۶۴۰ به همراه آنتی بیوتیک پنیسیلین واسترپتومایسین کشت داده و درفازلگاریتمی ازمحیط کشت جدا شد. انگل توکسوپلاسما گوندی نیز به صورت داخل صفاقی در موش سوری تکثیر گردید. سپس انگلها دوباربا PBS شستشو داده شد. سپس انگلها درویالی قرارگرفته و ویال ها درداخل ظرف حاوی یخ سونیکیت شد. سپس مخلوط از فیلترهای ۰/۴و ۰/۲ میکرونی عبور داده و لیوفیلیزه گردید(Silveira et al., 1998). تمامی این مراحل درمحیط کاملاًاستریل انجام می گیرد. با رقیق نمودن محلول استوک در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰غلظت‌های۱-۱۰-۵۰-۱۰۰و۵۰۰(µg/ml) عصاره تهیه گردید، سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

**کشت رده سلولهای سرطانی**

رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A2780)و حساس(A2780) به سیس پلاتین از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. مقدار ۱میلی لیتر از سلولها به فلاسک ۲۵ سانتیمتر مربع حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشتDMEM به همراه سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰% (۱۰۰میکروگرم) پنیسیلین، (۱۰۰ میکروگرم) استرپتومایسین منتقل شد. جهت انکوبه شدن در انکوباسون با دمایC ۳۷° درجه سانتیگراد و دی اکسیدکربن ۲۵% و رطوبت۹۵% قرار گرفت.

**تعیین سمیت سلولی سیس پلاتین**

جهت بررسی اثر سمیت داروی سیس پلاتین بر رده سلولی سرطانی مقاوم(CP-A2780 و حساس(A2780 به سیس پلاتین، از آزمون MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) استفاده شد (Bodo et al., 2005). برای انجام این تست پس از دوبار پاساژ دادن، سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۰٤ سلول A2780 و CP-A2780 به هرچاهک میکروپلیت ۹٦ خانه منتقل شد. د اروی سیس پلاتین با غلظتهای (۱-۱۰-۵۰-۱۰۰ و ۵۰۰µg/ml) بطور جداگانه به هر چاهک اضافه شد (هر غلظت ٤ بار تکرار شد). پس از ۲٤ساعت انکوباسیون، سوپ رویی دور ریخته شد و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI ۱٦٤۰ حاوی (5mg/ml/۰محلول MTT) افزوده شد سپس میکروپلیت به مدت ۳ساعت در انکوباتور با دمای 37˚C درجه سانتیگراد و دی اکسیدکربن 25% و رطوبت ۹۵% قرار گرفت سوپ رویی هر چاهک خارج و به هر ول مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO(Dimethyl sulfoxide) اضافه شد. پس از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه سوپ رویی هر چاهک خارج گردید و جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر (EMax®Endpoint) در طول موج ٦۹۰-٥٤۰ نانومتر قرائت شد.IC50(Half maximal inhibitory concentration) به‌وسیله نرم افزار Graphpad prism محاسبه گردید.

**میزان تکثیرسلول**

پس از هر تیمار، سلول‌ها با PBS شسته وبا استفاده از تریپسین سوسپانسیون سلولی از هر گروه(۱۲ گروه) آماده گردید. جهت بررسی میزان تکثیرسلول وشمارش سلول‌ها از رنگ آمیزی تری پانبلواستفاده شد.

**آنالیزآماری**

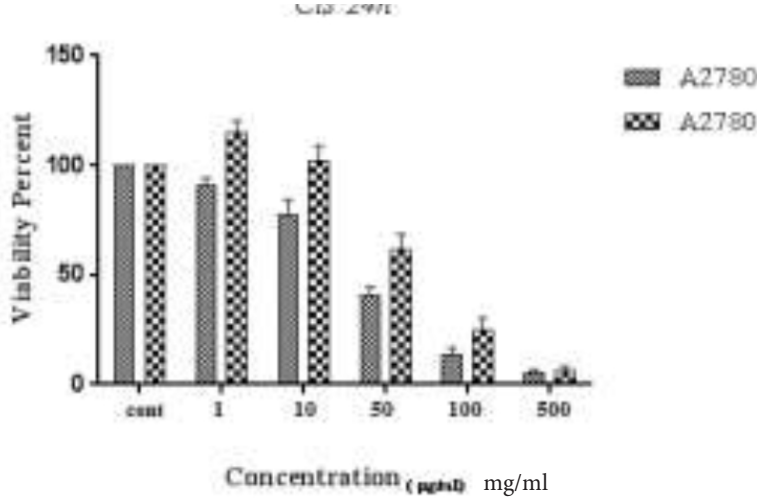
داده‌ها باحداقل سه تکرارمستقل به صورت میانگین ±SD ( انحراف استاندارد) ارائه گردید تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون Tukey با از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ جهت بررسی و معنی‌داری در سطح(P≤0/05)در نظر گرفته شد. نمودارها با برنامه Graphpad prism ترسیم شد.

**یافته ها**

**اثرات بازدارندگی داروی سیس پلاتین بر رده سلولی سرطانی A۲۷۸۰ و CP-A۲۷۸۰**

میزان تاثیرداروی سیس پلاتین بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین توسط تست MTT موردبررسی قرارگرفت. نتایج MTT نشان داد، غلظت بازد ارند ه ۵۰ درصدی داروی سیس پلاتین پس از گذشت ۲٤ساعت بر رده سلولی A۲۷۸۰ بطور میانگین IC۵۰= ۲۲,۷ µg/ml وبر رده سلولی سرطانی(CP-A۲۷۸۰)پس از گذشت مدت زمان ذکر شده

بطور میانگین IC۵۰=۶۳/۳۳ µg/ml می باشد. میزان تاثیر دارو در رده سلولی سرطانی مقاوم به سیس پلاتین (CP-A۲۷۸۰) نسبت رده سلولی سرطانی حساس به سیس پلاتین(A۲۷۸۰)با افزایش معناداری همراه بود(P< 0/05). همچنین مشاهده گردید غلظتهای ۱-۱۰-۵۰-۱۰۰و ۵۰۰(µg/ml) داروی سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطانی حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتینبه ترتیب دارای اثر کشندگی ۹%، ۳۳/۱۷%، ۶۳/۳۱%،۸۵/۱۴% و ۹۲/۹۶% می باشد. نتایج حاصل نشان داد غلظتهای ۱و ۱۰ (µg/ml) سیس پلاتین بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتین فاقد اثر کشندگی می باشد. در حالی که غلظتهای ۵۰-۱۰۰و ۵۰۰(µg/ml) آن بر روی رده سلولی ذکر شده به ترتیب دارای اثر کشندگی۳۸/۱۴%، ۷۴/۷۱%، ۹۳/۳۱% می باشد(p<0.05)(نمودار ۱).

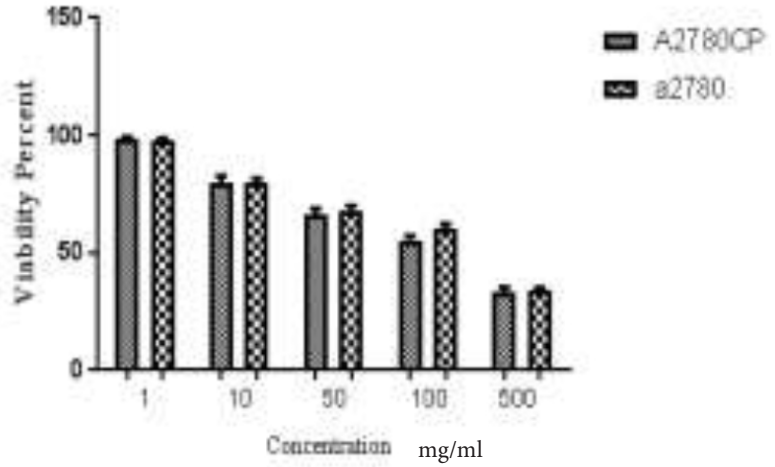



نمودار ۱: اثرات بازدارندگی داروی سیس پلاتین بر رده سلولی A۲۷۸۰ و CP-A۲۷۸۰ در تست ۲۴ساعته

## اثرات بازدارندگی عصارهی انگلی لیشمانیا ماژور بررده سلولی سرطانی A۲۷۸۰ و CP-A۲۷۸۰

میزان تاثیرعصاره ی انگلی لیشمانیا بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین توسط تست MTT موردبررسی قرارگرفت. نتایج MTT نشان داد، میزان تاثیر عصاره ی انگلی لیشمانیا ماژور روی رده سلولی سرطانی حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین به طور معناداری بیشتر از میزان تاثیر این عصاره بر رده سلولی سرطانی مقاوم(CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتینبود (P< ۰/۰۵).به گونه ای که به طور میانگین غلظت بازدارنده ۵۰ درصدی عصاره ی انگل لیشمانیاماژور بر رده سلولی سرطانی مقاوم(CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین به ترتیب IC۵۰= ۱۱۹/۹ µg/ml و IC۵۰= ۱۲۶/۶ µg/ml محاسبه گردید. نتایج به دست آمده نشان داد غلظت های ۱-۱۰-۵۰-۱۰۰و ۵۰۰(µg/ml)عصاره ی انگل لیشمانیاماژور بر رده سلولی سرطانی حساس به سیس پلاتین(A۲۷۸۰) به ترتیب دارای اثرکشندگی ۱/۵۵%، ۲۰/۲%، ۳۳/۷۱%، ۴۴/۵۱% و ۶۶/۷ % و بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتین به ترتیب دارای اثرکشندگی

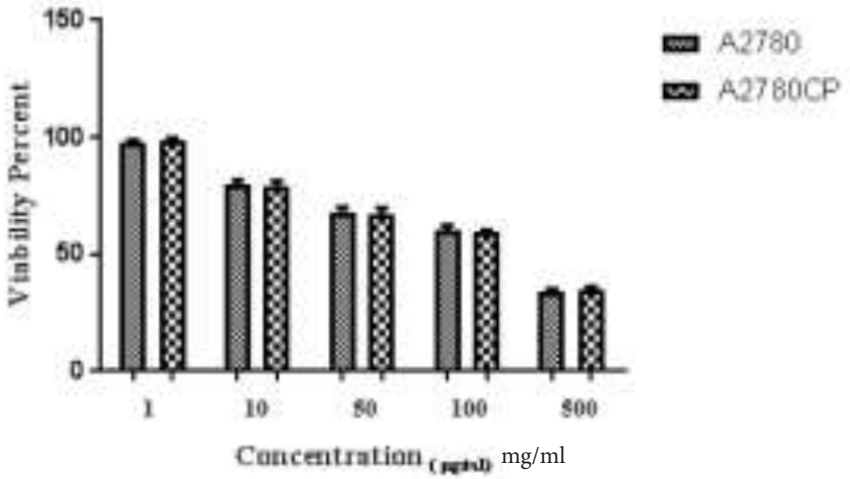
۸۱/۱%، ۲۰/٤٦%، ۳۵% ،٤٥/۰۹% و ٦۸% می باشند(نمود ار۲).




نمودار۲: اثرات بازدارندگی عصاره ی انگل لیشمانیا ماژوربرررده سلولی A۲۷۸۰ و CP-A۲۷۸۰

## اثرات بازدارندگی عصاره ی انگلی توکسوپلاسما گوندی برررده سلولی سرطانی A۲۷۸۰ و CP-A۲۷۸۰

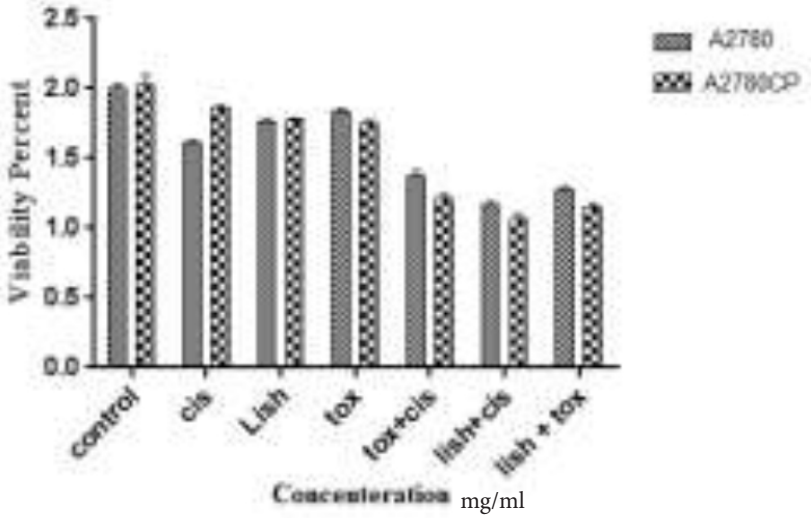
نتایج حاصل از میزان تاثیرعصاره ی انگل توکسوپلاسما گوندی دردوگروه آزمایشی رده سلولی سرطانی مقاوم(CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین توسط تست MTTمورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که غلظت های عصاره ی انگل توکسوپلاسما گوندی در هر دو گروه رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین به ترتیب بامیانگین غلظت بازدارنده ۵۰ درصدی دارای IC۵۰=۱٤۸,۳ و IC۵۰= ۱٤۳,٦ دارای اثر بازدارندگی می باشد. به طوری که اثر بازدارندگی در رده سلولی سرطانی مقاوم(CP-A۲۷۸۰)نسبت به رده سلولی سرطانی حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین با افزایش معناداری همراه بود($P\leq 0/05$).به گونه ای که غلظت های۱-۱۰-۵۰-۱۰۰و۵۰۰(µg/ml) عصاره ی توکسوپلاسما گوندی بر رده سلولی سرطانی حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین به ترتیب دارای اثرکشندگی ۱/۳٦%، ۲۰/۷٦%، ۳۳/۱۲% ، ٤۰/٦۸% و ٦۵/۱۵% و بر رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتین به ترتیب دارای اثرکشندگی ۱/۸۱% ، ۲۰/٤٦% ،۳۱/۸% ،۳۹/٤٦% و ٦٦% می باشد (نمودار۳).




نمودار۳: اثرات بازدارندگی عصاره ی انگل توکسوپلاسما گوندی برروده سلولی A۲۷۸۰ و A۲۷۸۰-CP

**میزان تکثیرروده سلولی سرطانی A۲۷۸۰-CP و A۲۷۸۰ تیمار شده با عصاره های انگلی توام با داروی سیس پلاتین حاصل از رنگ آمیزی تریپان بلو**

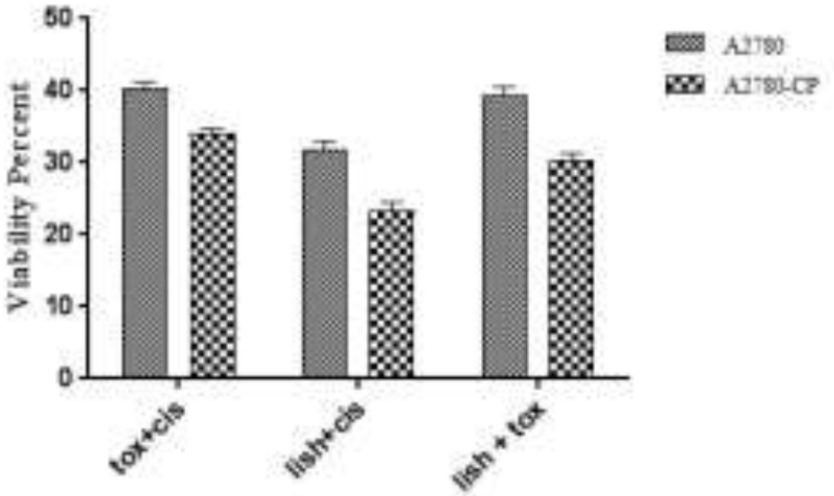
میزان تکثیر سلولی در دوگروه آزمایشی رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که به طور میانگین میزان تکثیر سلولی در گروه تیمار شده با سیس پلاتین در رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰)نسبت به رده سلولی سرطانی حساس (A۲۷۸۰)با افزایش معنادار و نسبت به گروه کنترل با کاهش معناداری همراه بوده است($p<0.05$). از نظر آماری تفاوت معناداری در گروه تیمار شده با عصاره ی انگل لیشمانیا ماژور درروده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتین نسبت به رده سلولی سرطانی حساس (A۲۷۸۰) به سیس پلاتین مشاهده نگردید، اما نسبت به گروه کنترل با کاهش معناداری همراه بود ($p<0.05$). این در حالی است که میزان تکثیر سلولی در گروه های تیمار شده با عصاره ی انگل توکسوپلاسما، عصاره ی انگل توکسوپلاسما توام با داروی سیس پلاتین، عصاره ی انگل لیشمانیا توام با داروی سیس پلاتین و عصاره ی انگل توکسوپلاسما توام با لیشمانیا در رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتین نسبت به رده سلولی سرطانی حساس (A۲۷۸۰) به سیس پلاتین و گروه کنترل با کاهش معناداری همراه بوده است($p<0.05$).




نمـودار٤: میـزان تکثیـرررده سـلولی A۲۷۸۰ و A۲۷۸۰-CP تیمـار شـده بـا عصـاره هـای انگلـی تـوام بـا داروی سـیس پلاتیـن حاصـل از رنـگ آمیـزی تریپـان بلـو

**درصد بقا سلولهای زنده**

آنالیز آماری نشان داد، درصد بقاء سلولهای زنده در گروه تیمار شده با عصاره ی انگل توکسوپلاسما گوندی توام با داروی سیس پلاتین در گروههای آزمایشی رده سلولی سرطانی حساس (A۲۷۸۰) و مقاوم (CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتین، به ترتیب ٤۰/۳۷% و ۳٤/۱٥% می باشد. درصد بقاء دررده سلولی سرطانی حساس (A۲۷۸۰) به سیس پلاتین، درمقایسه با رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتین، با تفاوت معناداری همراه بود($p<0.05$). همچنین درصد بقا سلولهای زنده در گروه تیمار شده با عصاره ی انگل لیشمانیا ماژور توام با داروی سیس پلاتین در گروههای آزمایشی رده سلولی سرطانی حساس (A۲۷۸۰) و مقاوم (CP-A۲۷۸۰) به سیس پلاتین به ترتیب ۳۱/۲۸% و ۲۳/۳۲% می باشد که با کاهش معناداری همراه بوده است($p<0.05$). در گروه تیمار شده با عصاره ی انگل توکسوپلاسما توام با عصاره ی انگل لیشمانیاماژور در گروههای آزمایشی رده سلولی سرطانی حساس (A۲۷۸۰) و مقاوم (A۲۷۸۰-CP) به سیس پلاتین درصد بقا سلولهای زنده نیز به ترتیب ۳۹/٤٦% و ۳۰/۲۹% گزارش گردید که با کاهش معناداری همراه بوده است ($p<0.05$).




نمـودار۵: درصـد سـلول هـای زنـده A۲۷۸۰ و A۲۷۸۰-CP تحـت تاثیـر عصـاره هـای انگلـی تـوام بـا داروی سـیس پلاتیـن

## بحث

سیس پلاتین به عنوان داروی ضدسرطانی با اتصال به DNA مهار رونویسی و مهار تقسیم سلولی را سبب می شود. بااین حال یکی از شایع ترین معضلات در درمان با این دارو مقاومت ایجاد شده به دلیل افزایش/ کاهش بیان پروتئین غشایی CTR1، افزایش فعالیت پروتئین های غشایی مقاومت دارویی MRP2، وجود متالوتیونین ها و گلوتاتیون و ... می باشد که با کاهش برداشت دارو از محیط اطراف سلول، انتقال دارو به خارج از سلول، غیر فعال شدن دارو و ... سبب ایجاد مقاومت سلول به دارو میگردد(Pabla, 2009; Beretta et al., 2004; Safaei & Howell, 2005; Holzer et al., 2004; Mellish et al., 1993; Kasahara, 1991; Kondo, 1995; Surowiak, 2007; Rabik & Dolan, 2007). مطالعات گوناگونی برروی تاثیر آنتی ژنهای انگلی در درمان شماری از بیماری ها از جمله سرطان صورت گرفته است. در این مطالعه میزان سمیت رد ه سلولی سرطانی مقاوم (A۲۷۸۰-CP)و حساس(A۲۷۸۰) به سیس پلاتین نسبت به داروی سیس پلاتین، عصاره های انگل توکسوپلاسما گوندی و لیشمانیا ماژور بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره های انگلی لیشمانیاماژوروتوکسوپلاسماگوندی دارای خاصیت ضدسرطانی می باشند. غلظت های ۵۰-۱۰۰و ۵۰۰(µg/ml) داروی سیس پلاتین سبب کاهش مقاومت سلولی در دو گروه آزمایشی رده سلولی سرطانی مقاوم (A۲۷۸۰-CP)و حساس (A۲۷۸۰)به سیس پلاتین گردید. از طرفی غلظت های ۱۰-۵۰-۱۰۰و ۵۰۰(µg/ml)عصاره ی انگل لیشمانیا ماژور و عصاره ی انگل توکسوپلاسما گوندی سبب کاهش مقاومت سلولی، رد ه سلولی سرطانی مقاوم (A۲۷۸۰-CP) و حساس (A۲۷۸۰)به سیس پلاتین گردید. نتایج حاصل از بررسی میزان تکثیر سلولی نشان د اد که با دریافت عصاره

های انگلیToxo Plasma Gandy Leishmania Major میزان تکثیر سلولی در دو گروه آزمایشی رده سلولی سرطانی مقاوم (CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰)به سیس پلاتین نسبت به گروه کنترل با کاهش معناد اری همراه بود ه است و بیشترین میزان کاهش تکثیر در دو گروه آزمایشی رد ه سلولی سرطانی مقاوم(CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰)به سیس پلاتین مربوط به گروه تیمار شد ه با عصاره ی انگل لیشمانیا توام با د اروی سیس پلاتین می باشد. نتایج حاصل از شمارش سلولهای مرد ه نشان د اد که تعد اد سلولها در هر دو رد ه سلولی سرطانی مقاوم(CP-A۲۷۸۰)و حساس(A۲۷۸۰)به سیس پلاتین در گروه عصاره ی انگل لیشمانیا توام با د اروی سیس پلاتین بیشتر می باشد. در مقایسه اثر درمانی عصاره ی انگل لیشمانیا توام با داروی سیس پلاتین موثرتر بود. در مطالعه ای که بر روی تأثیرآنتی ژن های کیست هید اتیدبرسلولهای سرطانی هلا انجام گرفت نشان د اد ه شد که آنتی ژن های کیست هید اتید سبب کاهش سلولهای سرطانی هلا در محیط کشت شد ه اند (Arefkhah, 2013).از طرفی در مطالعه ای دیگر، که بر روی تاثیر پروتواسکولکس کیست هید اتید بر سلولهای فایبروسارکومای WHEI-١٦٤ انجام شد نشان داده شد، که پروتواسکولکس ها سبب کاهش فرآیند رشد سلولهای فایبروسارکومای WHEI-١٦٤ می گردند(Magkos et al., 2007) نتایج حاصل از پژوهش ما نیز بیانگر تاثیر آنتی ژن های توتال عصاره های انگلی بر کاهش رشد سلولهای سرطانی دهانه گردن رحم در محیط کشت بود. در مطالعه ای که بر روی تاثیر مایع کیست هیداتید بر تمایز درسلولهای مونوسیتانسانی به دندرتیکسل انجام شد مشخص گردید که مایع کیست هیداتید سبب افزایش بیانCD١٤ و کاهش بیان CD1a گردیده است(Benkeblia, 2005). در مطالعات یوسفی دارانی و همکاران بر روی تاثیر آنتی ژن های تخم توکسوکاراکان سیس وانگل*ToxoPlasma gondii* بر تومور فیبروسارکومدرمدل موش نشان داده شد، که آنتی ژن های تخم توکسوکاراکان سیس وانگل توکسوپلاسما گوندی سبب مهار رشد تومورشده اند(Yosefi Darani et al., 2009). مطالعات هوبی و همکارانش بر روی اثرات آنتی ژنهای دفعی/ ترشحی٦ گونه نماتد بر رده های سلولی HGT-١ وD٤-HT٢٩ نشان داد، که آنتی ژنهای دفعی/ترشحی نماتودرودهای و نماتودیروسباتوس، سبب کاهش تکثیرسلولهای اپیتلیال محیط کشت می گردد(Huby et al., 1995). سایر مطالعات او بر روی اثرات آنتی ژنهای دفعی ترشحی تریکوسترونژیلوس فرمیس برروند تکثیرسلولهای اپیتلیال تخمدان و فیبروبلاست نشان داد، که آنتی ژنهای دفعی/ترشحی تریکوسترونژیلوس فرمی سسبب مهار تکثیرسلولهای اپیتلیال تخمدان و فیبروبلاست میگردند(Huby et al., 1999). این سوال که چگونه آنتی ژنهای انگلی با رشد تومورمواجه می شوندوچگونگی اثرات ضدسرطانی از خود بروز می دهند هنوز مشخص نمی باشد. گلیکوپروتئینهادربیولوژی انگل ها وهمین طوردرالقای احتمالی پاسخ ایمنی میزبان نقش دارند. از این روبه عنوان مولکولهایی جهت درمان سرطان ها مطرح می باشند (yousefi

& Darani, 2012). وجود ساختارهای – o گلیکانهای غیرنرمال به ویژه یک –o گلیکان ناقص در موسین سلول سبب ایجاد تغیراتی در ساختارهای کربوهیدراتی کوتاه مانند آنتی ژن alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine(Tn) آنتی ژنThomsen-Friedenreich (TF)وآنتیژنSialyle Tn ، میگردد (Hollingsworth&Swanson, 2004). از این رو، در چسبندگی سلول سرطانی به بافت اطراف، متاستاز، مرگ سلولی، رفتاربیولوژیکی و فنوتیپ سلول تغییراتی ایجاد میگردد( Wesseling et al., 1995 ). از آنجایی که ویروس پاپیلومای انسانی(HPV)با کد کردن گروهی از پروتئینهای ساختمانی و غیر ساختمانی سبب مهار عملکرد طبیعی مرگ برنامه ریزی سلول وچرخه تکثیر سلول می گردند( Yugawa& Kiyono, 2009 ). به نظر می رسد آنتی ژن های دفعی/ترشحی با تاثیر بر روی این پروتئین ها و فاکتورهای نکروز دهنده تومورαوβفعالیت ضدتوموری مستقیمی داشته باشند، به طوری که سبب از بین رفتن برخی ازسلولهای توموری وکاهش میزان تکثیرسلول ها می گردند(John, 2015) از طرف دیگر به نظر می رسد که موسینها به وسیله سلولهای کشنده، درممانعت از لیزسلولها نقش داشته باشند و با (Natural killer cell= NK) طبیعی لنفوسیتهای سیتوتوکسیک واردعمل شوند(Wesseling et al., 1995). با این حال چگونگی مکانیسم اثر آنتیژنهای دفعی/ترشحی سوالی بی پاسخ است که نیازمند تحقیقات گسترده ای می باشد. به امید اینکه نتایج احتمالی به دست آمده با انجام تحقیقات بیشتر بتواند در درمان سرطان سودمند واقع شود.

**نتیجه گیری**

نتایج این مطالعه نشان می د هد عصاره ها ی *Major Toxoplasma gondii*و *Leishmania* دارای خواص ضدسرطانی می باشند. نتایج نشان می دهد که خواص ضدسرطانی عصاره یانگل توکسوپلاسما نسبت به عصاره Leishmania بیشتر است. یافته ها نشان می دهد که مقاومت سلولهای سرطانی مقاوم (CP–A۲۷۸۰) به سیس پلاتین درحضورعصاره های انگلی ازبین رفته ودرصدسلول های زنده ونرخ تکثیردرحضوراین عصاره ها نسبت به رده سلولی سرطانی حساس (A۲۷۸۰)به سیس پلاتین کاهش می یابد. این کاهش درحضورعصاره *Toxoplasma gondii* نسبت به عصاره *Toxoplasma gondii* چشمگیرترمی باشد.

## منابع

Arefkhah, N., Shirzad, H., Mosavi, F., Taghipor, S., Daneshpor, S., Yousofi Darani, H. (2013) Effects of hydatid cyst antigens on Hella cells in vitro. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences 15(5): 65-71.

Bae, S.M., Lee, C.H., Cho, Y.L., Nam, K.H., Kim, Y.W., Kim, C.K. (2005) Two-dimensional-gel analysis of protein expression profie insquamous cervical cancer patients. Gynecologic Oncology Journal 99: 26-35.

Baruah, H., Rector, C.L., Monnier, S.M., Bierbach, U. (2002) Mechanism of action of non-cisplatin type DNA-targeted platinum anticancer agents: DNA interactions of novel acridinyl thioureas and their platinum conjugates. Biochemical pharmacology 64(2): 191-200.

Banerjee, S.K., Maulik, S.K. (2002) Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. Nutrition Journal 1: 4.

Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L. (2009) Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(38): 16281-6.

Beretta, GL., Gatti, L., Tinelli, S., Corna, E., Colangelo, D., Zunino, F. (2004) Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and-resistant cells. Biochemical pharmacology 68(2): 283-91.

Benkeblia, N. (2005) Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. Brazilian Archives of Biology and Technology 48(5): 753-59.

Bodo, J., Chovancova, J., Hunakova, L., Sedlak J. (2005) Enhanced sensitivity of human ovarian carcinoma cell lines A2780 and A2780/CP to the combination of cisplatin and synthetic isothiocyanate ethyl 4-isothiocyanatobutanoate. Neoplasma 52(6): 510-6.

Campos, A., Neto. (2005) what about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? Brazilian Journal of Medical and Biological Research 32: 979-984.

Du Bois, A., Lück, H-J., Meier, W., Adams, H-P., Möbus, V., Costa, S., (2003) A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as fist-line treatment of ovarian cancer. Journal of the National Cancer Institute 95(17): 1320-9.

Darani, H.Y., Shirzad. H., Mansoori, F., Zabardast, N., Mahmoodzadeh, M. (2009) Effcts of Toxoplasma gondii and Toxocara canis antigens on WEHI- 164 firosarcoma growth in a mouse model. The Korean Journal of Parasitology 47(2): 175-7.

Darani, H.Y., Yousef, M. (2012) Parasites and cancers: parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. Future Oncology 8(12): 1529-35.

Das Ghosh, D., Bhattacharjee, B., Sen, S.,Premi, L., Mukhopadhyay, I., Chowdhury, R.R., (2012) Some novel insights on HPV16 relatedcervical cancer pathogenesis based onanalyses of LCR methylation, viral load, E7and E2/E4 expressions. PLOS One 7: e44678.

Dasari, S., Tchounwou, P.B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. European journal of pharmacology 740: 364-78.

de Wit, R., Herrstedt, J., Rapoport, B., Carides, A., Guoguang-Ma, J., Elmer, M., (2004) The oral NK 1 antagonist, aprepitant, given with standard antiemetics provides protection against nausea and vomiting over multiple cycles of cisplatin-based chemotherapy: a combined analysis of two randomised, placebo-controlled Phase III clinical trials. European Journal of Cancer 40(3): 403-10.

Eastman, A. (1999) The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis. Cisplatin Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. 111-34.

Fuertes, M., Castilla, J., Alonso, C., Prez, J. (2003) Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. Current medicinal chemistry 10(3): 257-66.

Herwldt, B.L. (1999) Leishmaniasis. Lancet 354: 1191-9.

Holzer, A.K., Katano, K., Klomp, L.W., Howell, S.B. (2004) Cisplatin rapidly down-reg-

ulates its own inflx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. Clinical Cancer Research 10(19): 6744-9.

Hollingsworth, M.A., Swanson, B.J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. Nature reviews cancer 4(1): 45-60.

Huby, F., Hoste, H., Mallet, S., Fournel, S., Nano, J.L. (1995) Effects of the excretory/secretory productsof six nematode species, parasites of the digestive tract, on the proliferation of HT29-D4 andHGT-1 cell lines. Epithelial Cell Biology 4(4): 156-62.

Huby, F., Nano, J.L., Mallet, S., Hoste, H. (1999) Effects of the excretory/secretory products of Trichostrongylus colubriformis on the growth of different cell lines. International Journal for Parasitology 29(5): 697-702.

Jeon, B.D., Kim, J.H., Ryu, S. (2009) Differences of garlic powder ingestion and exercise training on blood lipids, MDA and SOD in rats. Life Sciences 19(10): 1337-45.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J.,Ward, E., Forman, D. (2011) Global cancer statistics. CA: ACancer Journal for Clinician 61: 69-90.

John, F. (2015) 8th edition Cellular and molecular immunology. Kennedy Blvd. Philadelphia. PA 19103-2899.

Kasahara, K., Fujiwara, Y., Nishio, K., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., (1991) Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. Cancer research 51(12): 3237-42.

Kondo, Y., Kuo, S-M., Watkins, S.C., Lazo, J.S. (1995) Metallothionein localization and cisplatin resistance in human hormone-independent prostatic tumor cell lines. Cancer research 55(3): 474-7.

Lamm, D.L. (1985) *Bacillus calmette-guerin* immunotherapy for bladder cancer. The Journal of Urology 134(1): 40-7.

Li, Y., Womer, R., Silber, J. (2004) Predicting cisplatin ototoxicity in children: the inflence of age and the cumulative dose. European Journal of Cancer 40(16): 2445-51.

Magkos, F., Patterson, B.W., Mohammed, B.S., Mittendorfer, B. (2007) A single 1-h bout of evening exercise increases basal FFA flex without affecting VLDL-triglycer-

ide and VLDL apolipoprotein B-100 kinetics in untrained lean men. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 292(6): 1568-74.

Magkos, F., Tsekouras, Y.E., Prentzas, K.I., Basioukas, K.N., Matsama, S.G., Yanni, A.E.(2008) acute exercise-induced changes in basal VLDL-triglyceride kinetics leading to hypotriglyceridemia manifest more readily after resistance than endurance exercise. Journal of Applied Physiology 105(4): 1228-36.

Mellish, K., Kelland, L., Harrap, K. (1993) In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. British journal of cancer 68(2): 24-50.

Milosavljevic, N., Duranton, C., Djerbi, N., Puech, P.H., Gounon, P., Lagadic-Gossmann, D. (2010) Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. Cancer research 70(19): 7514-22.

Montoya, J.G., Boothroyd, J.C., Kovacs, J.A. (2010) Toxo-plasma gondii. In: Mandell GL, Bennett JE, Dol-in R, editors. Mandell Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livigstone 3495-526.

Nakhostin-Roohi, B., Babaei, P., Rahmani-Nia, F., Bohlooli, S. (2008) Effect of vitamin C supplementation on lipid peroxidation, muscle damage and inflammation after 30-min exercise at 75% VO2max. The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness 48(2): 217-24.

Pabla, N., Murphy, R.F., Liu, K., Dong, Z. (2009) The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 296(3): 505-11.

Rabik, C.A., Dolan, M.E. (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer treatment reviews. 33(1): 9-23.

Reiner, S.L., Laksley, R.M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. Annual Review of Immunology 13: 151-177.

Salama, A. (2009) Drug-induced immune hemolytic anemia. Expert opinion on drug safety 80(1): 29-73.

Safaei, R., Howell, S.B. (2005) Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. Critical reviews in oncology/hematology 53(1): 13-23.

Siddik, Z.H. (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 22(47): 7265-79.

Silveirsa, F., Blackwell, J., Ishikawa, E., Braga, R., Shaw, J., Quinnell, R., SOONG, L., Kima, P., Mcmahon Pratt, D., Black, G. (1998) T cell responses to crude and defied leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with diffrent species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. Parasite immunology 20: 19-26.

Surowiak, P., Materna, V., Maciejczyk, A., Pudełko, M., Markwitz, E., Spaczyński, M., (2007) Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. Virchows Archiv 450(3): 279-85.

Wesseling, J., van der Valk, S.W., Vos, H.L., Sonnenberg, A., Hilkens, J. (1995) Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. The Journal of Cell Biology 129(1): 255-65.

Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., Nugent, K. (2007) Cisplatin nephrotoxicity: a review. The American journal of the medical sciences 334(2): 115-24.

Yousof, D.H., Soozangar, N., Khorami, S., Taji, F., Yousof, M., Shirzad, H. (2012) Hydatid Cyst Protoscolices Induce Cell Death in WEHI-164Fibrosarcoma Cells and Inhibit the Proliferationof Baby Hamster Kidney Fibroblasts In Vitro. Journal of Parasitology Research 304183.

Yugawa, T., Kiyono, T. (2009) Molecular mechanisms of cervical carcino genesis by high risk human papilloma viruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. Reviews in Medical Virology 19: 97-113.

Yoon, G. (2006) Effect of garlic supplement and exercise on plasma lipid and antioxidant enzyme system in rats. Korean Journal of Nutrition 39(1): 3-10.