بررسی اثر عصاره هیدروالکلی دانه گیاه کتان(.Linum Usitatissimum L) بر سمیت ژنتیکی ناشی از سیکلوفسفامید روی لنفوسیت های خون محیطی انسان

محمد شکرزاده[۱]، عباس محمدپور[۱]، مونا مدانلو[۱]، نرگس کارگر دارابی[۲]، فائزه خواجوی[۲*]

۱) گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲) گروه ژنتیک، دانشگاه غیرانتفاعی سنا مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۸ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۱**

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی هم چون گیاه کتان نقش مهمی در سلامت افراد و جوامع بشری دارند. با توجه به خواص فیتوشیمیایی گیاه کتان، در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات هیدروالکلی دانه این گیاه را بر سمیت ژنتیکی ناشی از سیکلوفسفامید در لنفوسیت های خون محیطی بررسی نمائیم.

مواد و روش ها: ابتدا عصاره دانه کتان به روش ماسراسیون با استفاده از حلال اتانول در دو نوبت تهیه شد. سپس نمونه های خونی بعد از ۱ ساعت انکوباسیون با غلظت های مختلف کتان، با ۷۵۰ µM در بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۲۴ساعت انکوبه گردید. سپس جهت ارزیابی تولید میکرونوکلئوس در لنفوسیت های دوهسته ای مهار شده در سیتوکینز، لام تهیه شد و با میکروسکوپ نوری بررسی گردید. سپس با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون(ANOVA (posttest:Tukey، مقادیر مختلف میانگین ها با هم مقایسه شد.

یافته های پژوهش: انکوبه کردن نمونه های خونی با سیکلوفسفامید موجب القای ژنوتوکسیسیته در لنفوسیت ها شده و مجاور نمودن سلول ها از قبل با عصاره هیدروالکلی دانه کتان به مقدار قابل توجهی تعداد میکرونوکلئوس ها را کاهش می دهد($P<0.0001$). نتایج این مطالعه نقش موثر عصاره دانه کتان به عنوان عامل محافظتی در برابر ژنوتوکسیسیته سیکلوفسفامید را نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری: در این پژوهش مشخص گردید که عصاره دانه کتان یک آنتی ژنوتوکسیک قوی در برابر آسیب های DNA ناشی از سیکلوفسفامید می باشد. و از آن جایی که عصاره دانه کتان به تنهایی اثرات سمیت سلولی ندارد، می توان از آن به عنوان یک عامل محافظتی در برابر اثرات سمی سیکلوفسفامید استفاده کرد.

واژه های کلیدی: ژنوتاکسیسیته، سیکلوفسفامید، دانه گیاه کتان، لنفوسیت انسانی

* نویسنده مسئول: گروه ژنتیک، دانشگاه غیرانتفاعی سنا مازندران، ساری، ایران

Email: faezekhajavi1370@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

ترکیبات شیمیایی و عوامل محیطی زیادی وجود دارند که قادر به ایجاد سمیت ژنتیکی سلول های بدن می باشند. در مقابل اثرات سمی، بدن انسان نیز به سیستم های دفاعی مجهز شده است که می توان به انواع آنزیم ها با خاصیت سم زدایی اشاره کرد. اما افزایش عوامل سمی و کاهش توان دفاعی بدن باعث انواع عوارض موتاژنی و کارسینوژنی و انواع سرطان ها می گردد(۱،۲). عوامل شیمیایی و محیطی می توانند باعث ایجاد رادیکال آزاد در درون سلول شده که این رادیکال های آزاد می توانند با ماکرومولکول های حیاتی مانند DNA برخورد کنند و شکست های کروموزومی ایجاد کنند و منجر به آسیب ژنتیکی شوند که به مرور زمان ممکن است بیماری های مزمنی مانند سرطان ایجاد کنند(۲).

سیکلوفسفامید دارویی وسیع الطیف بوده که در درمان سرطان های لنفوم، مالتیپل میلوما، لوکمی حاد مزمن و همینطور بیماری هایی مانند آرتریت روماتوئید کاربرد دارد. سیکلوفسفامید دارای عوارض جانبی بوده و باعث آسیب های کلیوی، کبدی و پیدایش التهاب حاد در دستگاه ادراری می گردد، که این موارد باعث محدود شدن کاربرد درمانی آن گشته است(۳). داروی سیکلوفسفامید با ایجاد اتصال بین دو رشته ملکولی DNA و شکستن DNA و نیز RNA و هم چنین مهار سنتز پروتئین اثر سلول کشی خود را اعمال می کند. این داروی آلکیله کننده مولکول ها، واکنشی تشکیل می دهد که گروه نوکلئوفیلیک روی بازو DNA به ویژه موقعیت ۷-ان گواتیل را آلکیله می کند، این مسئله سبب ایجاد پیوندهای جانبی میان بازوها و جفت شدن غیر طبیعی و شکستن مولکول DNA می شود(۴). در مطالعه ای که توسط ریمن و همکاران صورت گرفته به بررسی اثر محافظتی الاژیک اسید بر نفروتوکسیسیتی القا شده توسط سیکلوفسفامید پرداختند. تجویز خوراکی الاژیک اسید در دوزهای 50 and 100 mg/kg به مدت ۱۰ روز تاثیر معناداری در بیومارکرهای اکسیداتیو استرس و فرگمنته شدن DNA و ذخیره سازی انزیم های آنتی اکسیدانت مانند گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و کاتالاز شده است(۳). طی آزمایشی که توسط Jana´ına P. Moraes و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت، به بررسی اثر محافظتی جنتیسیک اسید در برابر سمیت ژنی و سمیت کبدی ناشی از سیکلوفسفامید در موش نژاد Swiss پرداختند. موش ها توسط جنتیسیک اسید در دوزهای 50 and 100 mg/kg به مدت ۱۴ روز متوالی تیمار شدند و پس از آن اثر بهبود دهندگی جنتیسیک اسید بر سمیت ژنتیکی، با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس یکپارچگی DNA مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت آنزیم های مختلف اکسیداتیو در بافت کبدی برآورد شد. بدین ترتیب مشخص گردید که فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان بازسازی شده و تشکیل ریز هستک و فراگمنته شدن DNA کاهش یافت(۵).

گیاهان دارویی نقش مهمی در سلامت افراد و جوامع بشری دارند. استفاده صحیح از گیاهان دارویی مستلزم شناخت ترکیب های شیمیایی موجود در آن ها است، زیرا وجود ترکیب های شیمیایی است که باعث اثر درمانی می گردد(۶). از جمله متابولیت های ثانویه می توان به ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها اشاره کرد. فلاونوئیدها به دلیل نقش آنتی اکسیدانی خود به طور مستقیم با وارد شدن در واکنش های احیایی مانع تنش اکسیداتیو می شوند و مانند بسیاری دیگر از پلی فنل ها جمع کننده رادیکال های آزاد هستند زیرا به عنوان گروه های قوی الکترون دهنده وپروتون دهنده عمل می کنند(۹-۷).

جنس کتان بزرگ ترین جنس خانواده کتان حدود ۳۴۲ گونه در جهان پراکنش دارد(۱۰). گونه هایی از آن بوته ای هستند و در نواحی گرمسیری یافت می شود در حالی که گونه های یک ساله و چند ساله آن در نواحی معتدل جهان یافت می شود(۱۱). کتان روغنی با نام علمی(Linum Usitatissimum L.) از گیاهان دارویی مهمی است که جهت استفاده از مواد موثره آن در صنایع دارویی و آرایشی و بهداشتی کشت آن همواره مورد توجه می باشد(۱۰). بذر کتان روغنی علاوه بر داشتن امگا-۳ دارای ویتامین E نیز می باشد. خاصیت مهم دیگر روغن کتان اثر ضد تورم و برطرف کردن میگرن های دردناک می باشد و هم چنین

مصونیت بدن را در مقابل بیماری ها بالا می برد(۱۲). گیاه کتان حاوی مقادیر بالایی ترکیبات لیگنانی مانند پودوفیلوتوکسین در انـــدام های مختلف خود است. لیگنان ها یکی از گروه های اصلی فیتـــواستروژن ها می باشند و در مواد غذایی مانند میوه ها، سبزیجات و دانه های روغنی به ویژه دانه کتان یافت می شود. لیگنان ها گروهی از ترکیبات طبیعی فنلی هستند که اسکلت کربنی آن ها بر اساس اتصـــال واحدهای C6 C3 بنا شده است و دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی می باشند(۱۲). مصرف بـــیشتر بذر کتان توسط انسان با مزایای بالقوه سلامت مرتبط است، به ویژه باعث پیشگیری از CVD، هایپرکلسترومی، علائم یائسگی و سرطان پستان و پروستات می گردد(۱۳،۱۴).

از آن جائی که سیـکلوفســـفامید به متابولیت های فعال مثل فســـفورامید موستـــارد و آکرولئین توسط سیتوکروم میکروزومال کبدی به همراه سیستم اکسیداز تبدیل می شود و اثر ضد نئوپلاستیک سیکلوفسفامید ناشی از فعالیت فسفورامید موستارد بوده و آکرولئین مسبب تظاهرات سمی در ارگـــان های غیر هدف می باشد و از سوی دیگر این گیاه با توجه به ترکیبات موجود مثل ترکیبات پلی فنلی و تریپنوئیدها می تواند نقش ضد رادیکالی داشته باشد و می تواند به عنوان جلوگیری کننده از اثرات سمی داروی مورد نظر مطرح گردد. با توجه به خواص فیتوشیمیایی گیاه کتان، در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات هیدروالکلی دانه این گیاه را بر سمیت ژنتیکی ناشی از سیـــکلوفســـفامید در لنفوسیت های خون محیطی بررسی نمائیم.

مواد و روش ها

تهیه گـــیاه و عـــصاره گیری: در این مطالعه آزمایشگاهی، بذر گیاه کتان پودر شده و از الک گذرانده می شود. پودر یک دست شده در ظرف شیشه ای و در جای خنـــک جهت عصاره گیری و انجام آزمایشات مربوطه مورد استفاده قرار گرفت(۱۵،۱۶).

عصاره بذر کتان به روش ماسراسیون با استفاده از حلال اتانول در دو نوبت تهیه کردیم. ابتدا ۵۰ گرم از پودر بذر گیاه الک شده با ترازوی دیجیتال توزین شد. پودر توزین شده را درون بشر ریخته و اتانول ۸۰ درصد به آن اضافه کردیم تا سطح پودر را کاملاً بپوشاند. مخلوط حاصل به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر با شدت ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق تکان دادیم. مخلوط اتانولی با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شد. به منظور حذف حلال و تغلیظ عصاره اتانولی از دستگاه تقطیر در خلا چرخان با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد استفاده گردید. عصاره به دست آمده در داخل آون قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. عصاره خشک شده توزین و در پلیت شیشه ای سربسته ریخته و با فویل آلومینیوم پوشانده شد و تا زمان انجام مراحل بعدی تحت شرایط مناسب نگهداری شدند(۱۵،۱۶).

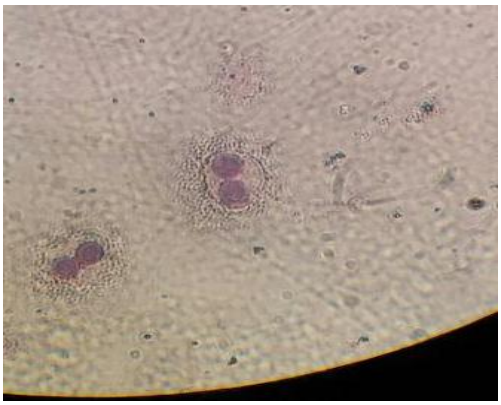
بررسی مـــیزان ســـمـــیت ســـلولی با تست میکرونوکلئوس: در این مطالعه تجربی پس از دریافت مجوز از کمـــیته اخـــلاق دانشـــگاه(کد اخلاق: ۳۰/۹۶/۳/۱۰۰۲) و با رضایت آگـــاهانه داوطلبین، ۷ سی سی خون از سه داوطلب سالم و غیر سیگاری که در ۶ ماه اخیر تحت رادیوتراپی و درمان آنتی بیوتیکی نبوده اند، دریافت گردید. نمونه های خونی به ۶ گروه مجزای ۱ میلی لیتری تقسیم می گردد: گروه کنترل (حلال)، گروه سیکلوفسفامید با دوز آسیب زای ۷۵۰ میکرومول، گروه محلول عصاره با دوزهای مختلف (۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول) به همراه ۷۵۰ میکرومول سیکلوفسفامید، تمامی دوزهای مورد استفاده بر اساس مطالعات گذشته انتخاب گردید و دوز ۷۵۰ میکرومول سیکلوفسفامید بهترین و اپتیموم دوز ایجاد کننده سمیت ژنتیکی در in vitro می باشد(۱۷).

در ابتدا نمونه های خونی به همراه غلظت های مختلف محلول عصاره بذر کتان، به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس سیکلوفسفامید به نمونه ها اضافه گردید و با محیط کشت RPMI (حـــاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک) به حجم نهایی ۴/۳ میلی لیتر رسید و ۰/۱ میلی لیتر ماده میتوژن PHA (جهت تحریک رشد لنفوسیت ها) افزوده شد. ظرف های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری شد و بعد از ۴۴ ساعت، ۶ µg/ml سیتـــوکلازین B (جهـــت تحریک هسته لنفوسیت ها به تقـــسیم شدن بدون تقسیم سلول) به آن ها افـــزوده می شود. ۷۲ ســـاعت پـس از کشت

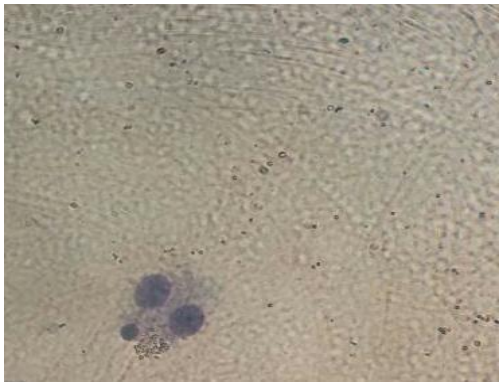
لنفوسیت ها، محصول برداری صورت گرفت(۱۷).

محتویات ظروف کشت به مدت ۸ دقیقه با دور ۸۰۰rpm سانتریفوژ گردید. بعد مایع فوقانی به آرامی خارج شده و به محتویات ته لوله، ۶ میلی لیتر محلول هیپوتونیک پتاسیم کلراید افزوده شـــد و بلافاصله نمونه ها با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع فوقانی برداشته شده و برای ثابت کردن سلول ها، محلول ثابت کننده شامل یک قسمت اسیداستیک گلاسیال و ۶ قسمت متانول به نمونه ها سانتریفوژ شد و این عمل به صورت پیاپی(حداقل ۳ بار) و تا زمانی که محلول رویی سلول ها شفاف و بیرنگ نماید، ادامه یافت و در آخرین مرحله پس از سانتریفوژ، محلول بالایی به میزانی برداشته شد که ته مانده لوله سانتریفوژ فقط ۰/۵ میلی لیتر باشد(۱۷).

پس از تهیه لام ها، رنگ آمیزی گیمسا صورت گرفت. لام ها با میکروسکوپ نوری و بزرگ نمایی ۴۰× و سپس ۱۰۰× مورد بررسی قرار گرفتند و به ازای هر نمونه، حداقل ۱۰۰۰ لنفوسیت دو هسته ای(شکل شماره ۱) و تعداد ریزهسته های(شکل شماره ۲) موجود در آن بررسی شد(۱۸).



شکل شماره ۱.یک سلول دوهسته ای سالم(بدون ریز هسته)



شکل شماره ۲. سلول دو هسته ای آسیب دیده(دارای ریز هسته)

در این مطالعه ابـــتدا اطلاعـــات به دست آمده از نمونه ها، دسته بندی می گردد و پس از تعیین میانگین ۲ نمونه، با اســـتفاده از نرم افـــزار SPSS و آزمون ANOVA (Post Test: Tukey)، مقادیر مختلف میانگین ها با هم مقایسه شده و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excell استفاده می شود. $P<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

آزمایشات ما نشان داد که عصاره هیدروالکلی بذر کتان در دوزهای مشـــخص به مـــــیزان قابل توجهی

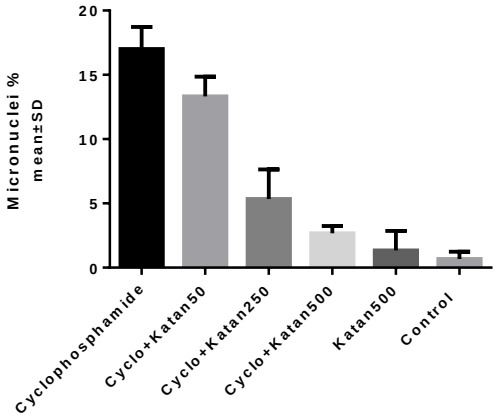
می تواند آسیب ژنتیکی ناشی از داروی سیکلوفسفامید را کاهش دهد. شکل شماره ۱ یک سلول دوهسته ای سالم را نشان می دهد و شکل شماره ۲ یک سلول دوهسته ای دارای میکرونوکلئوس(ریزهسته) را نشان می دهد که با بزرگ نمایی ۴۰× مشاهده گردید و سپس از آن عکس برداری شد.

جدول شماره ۱ تعداد میکرونوکلئوس های ایجاد شده در لنفوسیت های نمونه خونی گرفته شده از داوطلبان در شرایط invitro پس از مواجه با سیکلوفسفامید و اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی دانه کتان در غلظت های مختلف را نشان می دهد. با توجه به جدول شماره ۱ بالاترین میزان میکرو نوکلئوس مربوط به گروه سیکلوفسفامید به مقدار ۱۷/۰۰+۱/۷۳۲ و کمترین میزان میکرونوکلئوس مربوط به گروه کنترل به مقدار ۰/۶۶۶۷+۰/۵۷۷۴ می باشد. دوزهای ۲۵۰ µM و ۵۰۰ µM عصاره دانه کتان باعث تغییرات قابل ملاحظه ای در تعداد هسته های میکرونوکلئوس در مقایسه با نمونه بدون عصاره دانه کتان شده است. در مقایسه با کنترل مثبت، میزان میکرونوکلئوس ها به میزان ۶۸/۶۲ درصد و ۸۴/۳۱ درصد در سلول های قرار گرفته تحت ۲۵۰ µM و ۵۰۰ µM عصاره دانه کتان کاهش یافته است. بیشترین اثر محافظتی سیکلوفسفامید در نمونه حاوی ۵۰۰µM عصاره دانه کتان ملاحظه شد و هیچ گونه اثرات ژنوتوکسیک در کشت لنفوسیت ها با غلظت ۵۰۰µM عصاره دانه کتان به تنهایی مشاهده نشد.

جدول شماره ۱. تعداد میکرونوکلئوس های ایجاد شده در لنفوسیت های نمونه خونی گرفته شده از داوطلبان در شرایط invitro پس از مواجه با سیکلوفسفامید و اثر محافظتی عصاره دانه کتان در غلظت های مختلف

گروه	سیکلوفسفامید	سیکلو+کتان۵۰	سیکلو+کتان۲۵۰	سیکلو+کتان۵۰۰	کتان۵۰۰	کنترل
۱	۱۸	۱۵	۴	۳	۰	۱
۲	۱۸	۱۳	۴	۳	۳	۱
۳	۱۵	۱۲	۸	۲	۱	۰
Mean+SD	۱/۷۳۲+۱۷/۰۰	۱/۵۲۸+۱۳/۳۳	۲/۳۰۹+۵/۳۳۳	۰/۵۷۷۴+۲/۶۶۷	۱/۵۲۸+۱/۳۳۳	۰/۵۷۷۴+۰/۶۶۶۷

از نمودار شماره ۱ نتیجه می گیریم که بیشترین اثر محافظتی عصاره دانه کتان، در غلظت ۵۰۰ میکرومولار در برابر سیکلوفسفامید وجود دارد. علاوه بر آن مشاهده می شود با افزایش غلظت عصاره دانه کتان اثرات محافظتی آن در برابر سیکلوفسفامید بیشتر شد. هم چنین عصاره دانه کتان به تنهایی اثرات سمیت سلولی نداشته و خود به تنهایی عاملی برای سمیت ژنتیکی تلقی نمی شود و می توان از آن به عنوان یک عامل محافظتی در برابر اثرات سمی سیکلوفسفامید استفاده کرد.



نمودار شماره ۱. اثر محافظتی عصاره دانه کتان در شرایط invitro در غلظت های مختلف(۵۰۰µM-۲۵۰- ۵۰) در برابر آسیب های ژنتیکی ناشی از ۷۵۰µM سیکلوفسفامید بر لنفوسیت خونی انسان

داده ها در جدول شماره ۲ نشان می دهد که درصد میکرونوکلئوس لنفوسیت هایی که تحت سیکلوفسفامید (کنترل مثبت) قرار گرفتند به صورت قابل ملاحظه ای ($P<0.001$) بیشتر از سلول های کنترل است. در جدول بالا گروه های دریافت کننده دوزهای مختلف عصاره با گروه کنترل و شاهد به کمک آنالیز آماری و محاسبه P، آمده است. همان طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می شود تفاوت معناداری($P<0.0001$) بین نمونه کنترل در مقایسه با نمونه خونی مواجه شده با سیکلوفسفامید وجود دارد. هم چنین در مقایسه نمونه خونی مواجه شده با سیکلوفسفامید در برابر نمونه عصاره دانه کتان ۵۰۰ با سیکلوفسفامید تفاوت معناداری وجود دارد($P<0.0001$).

جدول شماره ۲. محاسبه P و آنالیز آماری گروه های دریافت کننده دوزهای مختلف عصاره(۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰) با گروه کنترل و شاهد

Tukey's multiple comparisons test	Significant?	Summary	P
Cyclophosphamide vs. Cyclo+Katan50	No	ns	0.0942
Cyclophosphamide vs. Cyclo+Katan250	Yes	****	< 0.0001
Cyclophosphamide vs. Cyclo+Katan500	Yes	****	< 0.0001
Cyclophosphamide vs. Katan500	Yes	****	< 0.0001
Cyclophosphamide vs. Control	Yes	****	< 0.0001
Cyclo+Katan50 vs. Control	Yes	****	< 0.0001
Cyclo+Katan250 vs. Control	Yes	*	0.0243
Cyclo+Katan500 vs. Control	No	ns	0.6002
Katan500 vs. Control	No	ns	0.9931

بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر، روش MN assay یکی از بهترین روش های پایه گذاری شده برای ارزیابی سیتوژنیک ناشی از مواد شیمیایی و تابش ها مورد استفاده قرار می گیرد. با پیشرفت های انجام شده توسط Fenech و Morley، این روش ارزیابی، بسیار حساس، ساده و سریع برای تشخیص عوامل القاکننده آسیب کروموزومی است(۱۷).

سیکلوفسفامید یک داروی ضد سرطان است که در بدن به یک متابولیت فعال آلکیله کننده تبدیل می گردد(۱۹). اثرات آنتی نئوپلاستیکی سیکلوفسفامید مربوط به فسفورآمید موستارد است. در حالی که آکرولین از طریق تداخل با سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بافت ها تولید رادیکال های آزاد اکسیژن کرده و مسئول پیدایش اثرات سمی مانند آپوپتوز، تشکیل تومورهای گوناگون و نکروز می باشد(۲۰،۱۹). مطالعات ما نشان داد که درصد میکرونوکلئوس لنفوسیت هایی که تحت سیکلوفسفامید(کنترل مثبت) قرار گرفتند به صورت قابل ملاحظه ای($P<0.001$) بیشتر از سلول های کنترل است. که با یافته های Uitdehaag و همکاران در سال ۱۹۸۹ هم خوانی دارد، آن ها دریافتند که دوزهای مختلف سیکلوفسفامید می تواند باعث تخریب لنفوسیت ها، به خصوص سلول های CD^{4+} و کاهش قابل توجه آن گشت(۲۱).

و همین طور در این مطالعه به این نتیجه رسیدیم که عصاره دانه کتان موجب کاهش آسیب وارده توسط سیکلوفسفامید روی لنفوسیت ها گشته است و با افزایش غلظت عصاره دانه کتان اثرات محافظتی آن در برابر سیکلوفسفامید بیشتر شد. بنا بر این عصاره هیدروالکلی دانه کتان به علت وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها می تواند از اثرات سمی سیکلوفسفامید روی لنفوسیت ها جلوگیری نماید. که با مطالعات Bhathena و همکاران در سال ۲۰۰۲ هم خوانی دارد که طی مطالعات بالینی بر روی موش و دیگر حیوانات گزارش کردند که گیاه کتان دارای اثرات آنتی اکسیدانی بوده و کاهش دهنده چربی خون و التهاب می باشد(۲۲).

طی آزمایشاتی که انجام دادیم متوجه شدیم کتان با دوز ۵۰۰ µM دارای اثر محافظتی بالاتری در برابر سیکلوفسفامید است. بنا بر این می توانیم از عصاره هیدروالکلی دانه کتان برای تولید دارو جهت کاهش

اثرات سمی داروی سیکلوفسفامید استفاده کنیم. از آنجایی که داروی سیکلوفسفامید اثرات ژنوتاکسیسیته بر روی اندام های مختلف بدن دارد و به علاوه این که یک داروی مهم در درمان سرطان ها می باشد ضرورت دارد با روش هایی این اثرات مخرب را کاهش دهیم و با توجه به یافته های ما عصاره هیدروالکلی دانه کتان می تواند گزینه مناسبی برای دستیابی به این هدف باشد.

References

1. Ahmadi A, Hosseinimehr SJ, Naghshvar F, Hajir E, Ghahremani M. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in Mice bone marrow cells. Arch Pharm Res2008;31:794-7. doi.org/10.1007/s12272-001-1228-z
2. Tiwari AK. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. Curr Sci 2001:1179-87. doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004
3. Rehman MU, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, Khan R, et al. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity genotoxicity and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino Mice the protective effect of Ellagic acid. Mole Cell Biochem 2012;365:119-27. doi.org/10.1007/s11010-012-1250-x
4. Hales BF. Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites 4-hydroxycyclophosphamide phosphoramide mustard and acrolein. Cancer Res 1982;42:3016-21.doi.org/ 0008-5472/82/0042-OOOOS02.00
5. Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, Rashid S, Ali N, Sultana S. Modulatory effects of gentisic acid against genotoxicity and hepatotoxicity induced by cyclophosphamide in Swiss albino Mice. J Pharm Pharmacol2012;64:259-67. doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01393.x
6. Hadipour A, Azizi M, Naghdi Badi H, Panahandeh J, Delazar A, Aroei H. Phytochemical diversity of Eremostachys laciniata bunge populations in Iran. J Med Plants 2016;1:9-18.
7. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants oxidative damage and oxygen deprivation stress a review. Annal Botan 2003;91 :179-94. doi.org/10.1093/aob/mcf118
8. Seyoum A, Asres K, Fiky FK. Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry 2006;67:2058-70. doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002
9. Yang B, Kotani A, Arai K, Kusu F. Estimation of the antioxidant activities of Flavonoids from their oxidation potentials. Analyt Sci 2001;17:599-604. doi.org/10.2116/analsci.17.599
10. Alfermann AW, Petersen M. Natural product formation by plant cell biotechnology. Plant Cell Tissue Org Cul1995;43:199-205. doi.org/10.1007/BF00052176
11. Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, Stöckigt J, Weiler EW, Deus B. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. Springer Berlin Heidel1977; 2:27-43 doi.org/10.1007/978-3-642-66646-9_3
12. Lewis JE, Nickell LA, Thompson LU, Szalai JP, Kiss A, Hilditch JR. A randomized controlled trial of the effect of dietary soy and flaxseed muffins on quality of life and hot flashes during menopause. Menopause 2006;13:631-42. doi.org/10.1097/01.gme.0000191882.59799 .67
13. Prasad K. Oxidative stress as a mechanism of diabetes in diabetic BB prone rats: effect of secoisolariciresinol diglucoside. Mole a Cell Biochem 2000;209:89-96. doi.org/10.1023/A:1007079802459
14. Thompson LU, Ward WE. Flaxseed lignans: health benefits, bioavailability, and safety. Phytoestrogens and health. 2002 Jun 30:405-26. doi:10.3390/ph12020068
15. Rahmati M, Shokrzadeh M, Darabi NK, Modanloo M, Fallah M, Mohammadpour A. The genoprotective effect of Naringin by mifepristone on human blood lymphocyte. Int Pharm Acta2017;1:150-1. doi.org/10.22037/ipa.v1i1.20497
16. Ayoola GA, Coker HA, Adesegun SA, Adepoju AA, Obaweya K, Ezennia EC, Atangbayila TO. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected

medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. Trop J Pharmaceut Res 2008;7:1019-24. doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14686
17. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mut Res Environ Relate 1985 1;147:29-36. doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9
18. Shokrzadeh M, Ahangar N, Abdollahi M, Shadboorestan A, Omidi M, Payam SH. Potential chemoprotective effects of selenium on diazinon induced DNA damage in Rat peripheral blood lymphocyte. Hum Exp Toxicol 2013;32:759-65. doi.org/10.1177/0960327112468179
19. Janelsins MC, Heckler CE, Thompson BD, Gross RA, Opanashuk LA, Slechta DA. A clinically relevant dose of cyclophosphamide chemotherapy impairs memory performance on the delayed spatial alternation task that is sustained over time as mice age. Neurotoxicology 2016;56:287-93. doi.org/10.1016/j.neuro.2016.06.013
20. Hill BT, Rybicki L, Carlstrom KD, Jagadeesh D, Gerds A, Hamilton B, et al. Daily weight based busulfan with cyclophosphamide and etoposide produces comparable outcomes to four times daily busulfan dosing for lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplan2016; 22:1588-95. doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.06.011
21. Uitdehaag BM, Nillesen WM, Hommes OR. Long lasting effects of cyclophosphamide on lymphocytes in peripheral blood and spinal fluid. Acta Neurol Scand1989;79:7-12. doi.org/10.1111/j.1600-0404.1989.tb03702.x
22. Bhathena SJ, Ali AA, Mohamed AI, Hansen CT, Velasquez MT. Differential effects of dietary flaxseed protein and soy protein on plasma triglyceride and uric acid levels in animal models. J Nut Biochem2002Nov1;13:684-9. doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00227-9

Effects of Flaxseed (Linum Usitatissimum L.) against Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide on Human Blood Lymphocyte

Shokrzadeh M[1], Mohammadpour A[1], Modanloo M[1], Kargardarai N[2], Khajavi F[2]*

(Received: August 19, 2017 Accepted: April 10, 2019)

Abstract

Introduction: Medicinal plants, such as flaxseeds play an important role in the health of individuals and communities. Regarding the phytochemical properties of flaxseed, this study aimed to investigate the hydroalcoholic effects of this plant on the genetic toxicity of cyclophosphamide in peripheral blood lymphocytes.

Materials & Methods: The flaxseed extract was initially prepared by maceration using ethanol solvent in two rounds. After one hour of incubation with different concentrations, the blood samples were incubated with 750 µM in a bain-marie at 37° C for 24 h. To evaluate the production of micronucleus in dual nuclear lymphocytes suppressed in cytokines, the slides were prepared and evaluated using light microscopy. The data were analyzed in SPSS software and the mean values were compared using Tukey's test and.

Ethics code: 30.96.3.1002

Findings: The incubation of blood samples with cyclophosphamide leads to induced additional genotoxicity in lymphocytes. Moreover, flaxseed extract pretreatment significantly reduced the micronucleus frequency ($P<0.0001$). In addition, the results showed the effective role of flaxseed extract as a protective agent in reducing the genotoxicity of the pesticide cyclophosphamide.

Discussion & Conclusions: According to the obtained results, flaxseed is a potent antigenotoxic agent against cyclophosphamide-induced DNA damage. Since the flaxseed extract does not have cytotoxic effects, it can be used as a protective agent against the toxic effects of cyclophosphamide.

Keywords: Cyclophosphamide, Flaxseed, Genotoxicity, Human lymphocyte

1. Dept of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

2. Dept of Genetics, Mazandaran Sana non-Profit institution, Sari, Iran

**Corresponding author Email: faezekhajavi1370@gmail.com*