زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۸۲- ۶۹

مقاله پژوهشی

اثر بازدارنده رشد تایموکوئینون بر سلول‌های سرطانی راجی در لنفوم بورکیت

مرتضی داودی[۱]، شهریار سعیدیان[۱]، رضا صغیری[۲*]، زهرا زمانی[۲]، غلامرضا بخشی خانیکی[۳]

۱- گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: reza_saghiri@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1957749.1388

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۸

چکیده

گیاهان دارویی به علت ارزانی و قابل دسترس بودن و پذیرش بهتر بیماران، مورد توجه هستند. یکی از این گیاهان سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) است. در این مطالعه اثر ضد تکثیری تایموکوئینون که ترکیب اصلی روغن دانه‌های سیاه‌دانه است، بر روی رده‌ی سلول‌های راجی بررسی می‌شود. سلول‌های راجی لنفوسیت‌های B سرطانی هستند که در لنفوم بورکیت در مراکز زایای این سلول‌ها دیده می‌شوند. در تحقیق حاضر، سلول‌های راجی با رقت‌های مختلف تایموکوئینون از صفر تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیمار شدند و تعیین درصد سلول‌های زنده با روش تریپان بلو و تست MTT صورت گرفت. همچنین جهت نشان دادن درصد سلول‌ها در مراحل مختلف رشد از روش فلوسایتومتری و کیت Annexin V-FITC/PI استفاده شد. بیان ژن *c-Myc* که مهمترین ژن تغییر یافته در ایجاد لنفوم بورکیت است با روش Real Time - PCR مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری نیز با استفاده از نرم‌افزار SPSS 2020 انجام شد. این مطالعه نشان داد که تایموکوئینون می‌تواند بطور وابسته به غلظت و وابسته به زمان موجب مهار رشد سلول‌های راجی شود. تایموکوئینون ضمن سرکوب بیان ژن *c-Myc* با درصد قابل توجهی موجب ورود سلول‌های راجی به مرحله مرگ برنامه‌ریزی شده و یا آپوپتوز می‌شود و توان بالقوه در درمان‌های جانبی بیماری لنفوم بورکیت را دارد.

کلمات کلیدی: لنفوم بورکیت، سیاه‌دانه، تایموکوئینون، سلول‌های راجی، ریل تایم پی‌سی‌آر.

مقدمه

لنفوم یک واژه‌ی عمومی گسترده برای سرطان در سلول‌های سیستم لنفاوی است. لنفوم از لنفوسیت‌های غدد لنفاوی و یا دیگر بافت‌های لنفاوی شروع می‌شود. دو گروه عمدهٔ این بیماری شامل لنفوم هوچکین (HL) و غیرهوچکین (NHL) است. هر دو گروه به زیرگروه‌های بیشتر تقسیم می‌شوند. تقسیم بندی بر اساس راه‌های ایجاد و منشأ بیماری است (۷، ۱۸). لنفوم بورکیت یکی از زیر گروه‌های NHL است. یک نوع سرطان سیستم لنفاوی بویژه لنفوسیت‌های B که در مرکز زایای این سلول‌ها در گره‌های لنفی دیده می‌شود (۵، ۶). در سال ۱۹۶۳ میلادی دانشمندی به نام پالورتافت سلول‌هایی را از لنفوسیت‌های B یک

پسربچه ۱۱ ساله نیجریایی مبتلا به لنفوم بورکیت جدا کرد که سلول‌های راجی (Raji cells) نامیده شدند. این سلول‌ها اولین رده سلولی انسانی پیوسته از منشأ سلول‌های خون‌ساز هستند (۱۵، ۲۳). داروهای شیمی درمانی که برای درمان لنفوم مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل: آدریامایسین، بلئومایسین، وین‌بلاسین، داکاربازین، اتوپوساید، دوکسوروبیسین، سیکلوفسفامید، پروکاربازین، پردنیزون و ریتوکسی‌ماب است. بسته به نوع و شدت بیماری ترکیبی از این داروها همراه با رادیوتراپی مورد استفاده قرار می‌گیرد. عارضه جانبی این داروها سمیت ریوی است که بطور عمده مربوط به بلئومایسین است. مصرف این داروها عوارض قلبی عروقی نیز درپی خواهد داشت. با وجود اینکه درمان‌های رایج در بیماران مبتلا به HL نرخ بهبود را افزایش بخشیده، با این حال میزان مرگ و میر در مراحل پیشرفته به ۳۰ درصد و در مراحل اولیه بیماری بین ۵ تا ۱۰ درصد است. میزان مرگ و میر در NHL بسته به نوع زیر گروه بیماری متفاوت است و به ۴۰ درصد نیز می‌رسد (۱۴، ۲۱).

برای نتیجه بهتر و موفق‌تر در کنترل هر بیماری، تحقیق و معرفی داروهای جدید همواره ادامه خواهد داشت. بیماری لنفوم نیز از این قاعده مستثنی نیست. لنفوم بورکیت به علت ایجاد یک جابجایی کروموزومی از نوع متعادل و دوطرفه ایجاد می‌شود. جابجایی بین ژن‌های مربوط به ایمونوگلوبولین در کروموزوم‌های ۲، ۱۴، ۲۲، و *c-Myc* در کروموزوم ۸ رخ می‌دهد. در ۸۰ درصد موارد لنفوم بورکیت، جابجایی *c-Myc* به لوکوس ایمونوگلوبولین H از کروموزوم ۱۴ است که منجر به تشکیل (q۳۲:q۲۴) (۸:۱۴) می‌شود. در ۱۵ درصد موارد جابجایی به لوکوس کاپا در کروموزوم ۲q۱۱ و در ۵ درصد موارد به لوکوس لامبدا در کروموزوم ۲۲q۱۱ مربوط می‌باشد. در نتیجه‌ی این جابجایی‌ها ژن *c-Myc* از لحاظ رونویسی به شدت فعال می‌شود. در این حالت پروموتور ۱ (P1) ژن *c-Myc* بیشتر از پروموتور ۲ (P2)، که در حالت عادی فعال است، فعال می‌شود. این تغییر بعنوان جابجایی پروموتوری شناخته می‌شود (۱۱). دلیل اینکه در لنفوم بورکیت اغلب ترانسلوکاسیون t(8;14) وجود دارد این است که کروموزوم ۸ در لنفوسیت‌های B از نظر فضایی به کروموزوم ۱۴ نزدیکتر است (۱۷، ۲۵).

در گروهی از سرطان‌ها ژن *Myc* بطور پایدار بیان می‌شود که منجر به افزایش پروتئین MYC شده و این پروتئین موجب افزایش بیان بسیاری از ژن‌ها می‌شود. برخی از این ژن‌ها در تکثیر سلول و ایجاد سرطان دخیل هستند (۲۸).

پروتئین MYC از اعضای شبکه فاکتورهای رونویسی bHLHZ (basic helix-loop-helix leucine zipper) است که در تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلول دخالت دارد. پروتئین MYC دارای توالی اسید آمینه‌های خاصی است که به توالی مشخصی از DNA اتصال می‌یابد اما به تنهایی نمی‌تواند اتصال قوی با DNA داشته باشد. برای اتصال پروتئین MYC به DNA، دایمر شدن آن با پروتئین MAX (MYC associated factor X) لازم است (۴، ۸، ۱۲).

به دلیل اینکه پروتئین MYC فاقد جایگاه فعال خاص برای ریزمولکول‌هایی است که بعنوان دارو استفاده می‌شوند، مهار فعالیت آن با استفاده از ریزمولکول‌های داروئی میسر نخواهد بود. دیگر اینکه پروتئین MYC بطور مشخص در هسته وجود دارد و هدف‌گذاری آن با آنتی بادی‌های تک ظرفیتی خاص از نظر تکنیکی عملی نخواهد بود. بنابراین هدف‌گذاری غیرمستقیم این پروتئین مورد توجه قرار می‌گیرد. داروهای مورد استفاده در این زمینه شامل داروهایی است مانند JQ1 که یک مهارکننده‌ی قدرتمند در مرحلهٔ رونویسی است و با اتصال به لایزین‌های استیله شده از

رونویسی ممانعت می‌کند. همچنین GSK525762 یک مهارکننده مرحله‌ی رونویسی است که در حال حاضر در فاز اول آزمایشات بالینی برای بدخیمی‌های پروسه‌ی خون‌سازی و تومورهای جامد قرار دارد (۸). راپامایسین (rapamycin) مهارکننده‌ای است که از ترجمهٔ mRNA ژن *Myc* جلوگیری می‌کند. مکانیسم اثر راپامایسین مداخله و مهار مسیر PI3K است که با این ممانعت از رشد، سلول به سمت آپوپتوز هدایت می‌شود (۲۶). داروهای ضد سرطان که موجب کاهش و یا توقف رشد سلول‌های بدخیم می‌شوند، اثراتی ناخواسته بر سلول‌های طبیعی بدن نیز خواهند داشت. بعنوان مثال استفاده‌ی طولانی مدت از راپامایسین موجب افزایش مقاومت به انسولین هم در انسان و هم در حیوانات آزمایشگاهی است (۲۹).

ریزمولکول‌هایی نیز معرفی شده‌اند که از دایمر شدن MYC–MAX ممانعت می‌کنند، مانند Omomyc که یک پپتید bHLH جهش یافته است و در بسیاری از مدل‌های توموری موشی، از این دایمر شدن جلوگیری می‌نماید (۲).

گیاهان دارویی بعلت ارزانی و قابل دسترس بودن و پذیرش بهتر از طرف بیماران، برای درمان بیماری‌ها از جمله سرطان مورد توجه هستند. یکی از گیاهان دارویی مورد توجه، سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) است. سیاه‌دانه گیاهی است یک ساله، علفی و از تیره آلاله (Ranunculaceae) (۱۹). طول آن به ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر می‌رسد و دارای گل‌های سفید، زرد، صورتی، آبی کمرنگ و قرمز است (۲۰). این گیاه در جنوب آسیا Black Cumin، در زبان عربی حب السودا و در زبان لاتین Panacea نامیده می‌شود (۹).

دانه‌های سیاه‌دانه که بعنوان زیره سیاه نیز شناخته می‌شود، عموماً بعنوان ادویه و چاشنی بکار می‌روند. در طب سنتی سیاه‌دانه به اشکال گوناگون برای درمان بسیاری از بیماری‌ها بکار می‌رود، بیماری‌هایی مانند آسم، فشارخون، دیابت، التهاب، سرفه، برونشیت، سردرد، اگزما، تب، سرگیجه و انفلوآنزا. تحقیقات اخیر در کشورهای مسلمان نشان می‌دهد که سیاه‌دانه بطور گسترده توسط بیماران مبتلا به سرطان بعنوان مکمل غذایی و مکمل دارویی همراه با شیمی درمانی استفاده می‌شود. عصاره دانه‌های سیاه‌دانه، روغن و اسانس روغنی آن طیفی از فعالیت‌های بیولوژیکی مطلوب نشان می‌دهند که برجسته‌ترین آنها شامل اثر آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد میکروب، حفاظت از کبد، ضد جهش و ضد تومور است. دانه سیاه‌دانه حاوی روغن، پروتئین‌ها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، و اسانس است و برجسته ترین ترکیب اسانس سیاه‌دانه، تایموکوئینون یا TQ نامیده می‌شود (۲۲).

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد تکثیر و باز دارنده رشد تایموکوئینون بر روی سلول‌های راجی است که در بیماری لنفوم بورکیت دیده می‌شوند.

مواد و روش‌ها

تایموکوئینون بصورت پودر لئوفلیزه و با کد شیمیایی (Chemical Abstracts Service) CAS = 490-91-5 از شرکت Sigma Aldrich آلمان و رده‌ی سلولی راجی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران در تهران تهیه شد. ویال سلول‌های راجی در محیط آزمایشگاه قرار گرفت تا از حالت انجماد خارج شود. سپس در فلاسک‌های ۲۵ میلی‌لیتری و در محیط کشت RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) کشت داده شد. تعیین تعداد سلول‌های زنده نیز با روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام گرفت.

زنده‌مانی سلول (cell viability): سلول‌های راجی تهیه شده پس از خروج از فریزر و ذوب شدن در دمای اتاق در فلاسک‌های مجزا با زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شد (پس از هر ۲۴ ساعت سلول‌ها سانتریفوژ شده و محیط

کشت رویی تخلیه شده و محیط کشت تازه افزوده شد). پس از زمان‌های ذکر شده محیط کشت حاوی سلول‌ها در لوله‌های فالکون استریل تخلیه شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از تخلیه محیط کشت رویی به سلول‌ها که در ته لوله رسوب کرده بودند مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت تازه حاوی FBS (بافر فسفات سالین) افزوده شد. از سوسپانسیون سلولی تهیه شده برای رنگ آمیزی با رنگ تریپان بلو ۰/۲۵ درصد و شمارش سلول استفاده گردید. در این روش حجم کمی از سوسپانسیون سلولی تهیه شده (۵۰ میکرولیتر) به نسبت یک به یک با رنگ تریپان بلو مخلوط شد و شمارش سلول‌ها با لام نئوبار انجام گرفت. در این روش سلول‌های رنگ نگرفته زنده و در دید میکروسکوپی دارای غشاء صاف و سلول‌های دارای غشاء چروکیده و رنگ گرفته (به دلیل از بین رفتن انسجام غشای سیتوپلاسمی و نفوذ رنگ به درون سلول) سلول‌های مرده هستند. پس از شمارش، درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه شد:

درصد سلول‌های زنده = تعداد سلول‌های زنده/ تعداد کل سلول‌ها × ۱۰۰

درصد مطلوب سلول‌های زنده برای آزمایش MTT حدود درصد است. به دلیل شرایط مختلف از جمله تاریخ تهیه و منجمد سازی سلول، نگهداری بصورت فریز شده، نوع محیط کشت استفاده شده و شرایط آزمایشگاهی مختلف، زمان انکوباسیون لازم برای رسیدن به درصد مطلوب ۸۰ درصد متفاوت خواهد بود. در شرایط این مطالعه پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته درصد سلول‌های زنده به ۸۰ درصد رسیده است. از این سلول‌ها سوسپانسیونی تهیه گردید که در آزمایش MTT مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش MTT: آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی بر اساس احیای نمک زرد رنگ تترازولیوم با نام ۳-(۴، ۵ دی متیل تیازول-۲-یل)-۵،۲- دی غنیل تترازولیوم بروماید است. این آزمایش برای سنجش فعالیت متابولیک سلول بعنوان نشانگر زنده بودن سلول بکار می‌رود. سلول‌های زنده دارای آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز وابسته به NAD(P)H هستند که نمک تترازولیوم را به فورمازان تبدیل می‌کند. فورامازان یک کریستال نامحلول به رنگ ارغوانی تیره است. کریستال‌های فورمازان با استفاده از محلول حل کننده (DMSO) حل می‌شود و میزان جذب نوری آن توسط دستگاه خوانش جذب نوری در طول موج ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر ثبت می‌شود. هر اندازه که رنگ محلول تیره تر باشد تعداد سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیک بیشتر است (۱۶). تعداد چهل هزار (۴۰۰۰۰) سلول از سوسپانسون سلولی تهیه شده در مرحلهٔ قبل در هر چاهک پلیت ۹۶ تایی مخصوص کشت در حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت همراه با رقت‌های مختلف TQ (۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تلقیح شد. (برای هر رقت سه چاهک در نظر گرفته شد). پلیت‌ها در انکوباتور کشت سلول (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵درصد CO_2) قرار گرفت و پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، بطور جداگانه ۵۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک افزوده شده و انکوباسیون مجدد به مدت ۱۸۰ دقیقه انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (به عنوان محلول حل‌کننده کریستال‌های فورامازون) افزوده شد. در نهایت میانگین جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید. برای حذف جذب نوری زمینه از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر دوم استفاده شد. در بررسی‌های آماری نیز $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شده و برای تعیین درصد سلول‌های رشد کرده و برآورد IC50 از فرمول زیر استفاده گردید:

درصد سلول‌های رشد کرده نسبت به کنترل = میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده/میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل × ۱۰۰

فلوسایتومتری: جهت بررسی مراحل مختلف رشد و تعیین میزان آپوپتوز و نکروز از روش فلوسایتومتری و از کیت Annexin V-FITC/PI استفاده می‌شود. به این منظور آزمایش بر روی سلول‌های تیمار شده با غلظت ثابت ٤٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر TQ در سه روز متوالی (٢٤، ٤٨ و٧٢ ساعت) انجام شد. آنکسین V (و یا Annexin A5) یکی از پروتئین‌های درون سلولی است که بطور وابسته به کلسیم، به فسفاتیدیل سرین اتصال می‌یابد. فسفاتیدیل سرین در سلول‌های سالم بطور طبیعی تنها در لایهٔ درونی غشای پلاسمایی دیده می‌شود اما در طی مراحل اولیه‌ی آپوپتوز که این عدم تقارن از دست می‌رود، فسفاتیدیل سرین به لایه-ی بیرونی غشاء منتقل می‌شود. آنکسین V که با فلوروکروم FITC (Fluorescein-5-isothiocyanate) نشاندار شده است می‌تواند بطور اختصاصی به PS اتصال یابد و سلول‌های آپوپتوتیک را مشخص سازد. اتصال آنکسین به تنهایی نمیتواند سلول‌های آپوپتوز شده و یا نکروز شده را متمایز سازد. بمنظور تفکیک سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک از محلول پروپیدیوم یدید استفاده می‌شود که می‌تواند در سلول‌های آپوپتوتیکی که در مرحله‌ی آخر آپوپتوز هستند و سلول‌های نکروز شده که انسجام غشاء هسته از دست رفته است به هسته نفوذ کرده و به DNA اتصال یابد. پروپیدیوم یدید (PI) یک رنگ فلورسنت است که با تحریک نور لیزر با طول موج ٤٨٨ نانومتر رنگ قرمز ایجاد می‌کند و شدت رنگ ایجاد شده با فیلتر ٦١٠ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. از این محلول در ارزیابی زنده بودن سلول و یا تعیین محتوای DNA سلول در بررسی‌های سیکل سلولی استفاده می‌شود (٢٤).

۲-۳-۱ - انتخاب غلظت مناسب تایموکوئینون برای فلوسایتومتری: با توجه به آزمایش MTT و تعیین مقادیر غلظت IC50 برای زمانهای تیمار ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت، محدوده غلظت مؤثر TQ برای فلوسایتومتری بین ۳۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. برای تعیین غلظت مناسب در این محدوده، تعداد ٤٠٠٠٠ سلول طبق روش قبل در سه ردیف چاهک-های مجزا در پلیت ٩٦تایی کشت داده شد و غلظت‌های ۳۰۰، ٤٠٠ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از TQ به هر سری بصورت مجزا افزوده شد. پس از زمان تیمار ٢٤ ساعت، یک منحنی نقطه‌ای فلوسایتومتری برای هر یک از غلظت‌ها تهیه گردید. مقایسه منحنی‌های بدست آمده نشان داد که غلظت مناسب برای تفکیک مطلوب مراحل آپوپتوز و نکروز سلول‌ها غلظت ٤٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر است. در منحنی بدست آمده با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر تراکم سلول‌ها در منطقهٔ Q3 در منحنی فلوسایتومتری که مربوط به سلول‌های زنده است افزایش می‌یابد و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر، تراکم سلول‌ها بیشتر در منطقه Q1 که مربوط به سلول‌های نکروز شده است خواهد بود (به شکل ۳ رجوع شود). غلظت ٤٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر تقریبا برابر با غلظت IC50 در انکوباسیون ٢٤ ساعت است.

ریل تایم پی‌سی‌آر (RT-PCR): میزان بیان ژن *c-Myc* با روش ریل تایم PCR بررسی شد. بیان این ژن در مقایسه با ژن *GAPDH* بعنوان ژن خانه‌دار (housekeeping) سنجیده شده و جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده را که با نرم‌افزار Oligo بدست آمده نشان می‌دهد. برای آماده سازی سلول‌ها جهت انجام ریل تایم PCR از تعداد یک میلیون سلول استفاده شده که با غلظت ٤٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر TQ به مدت ٢٤ ساعت تیمار شده‌اند. پس از

انکوباسیون، RNAهای سلول توسط کیت استخراج RNA شرکت Gene All استخراج شده و از این RNAهای استخراج شده برای تهیه cDNA توسط کیت یکتا تشخیص آزما استفاده شد. cDNA سنتز شده تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های *GAPDH* و *c-Myc*

gene	Sequence	TM
GAPDH	F: AGGGCTGCTTTTAACTCTGG R: CCCCACTTGATTTTGGAGGG	60
c-Myc	F: GGGAAGAAGCCAGTTCAGATC R: GGAAGCAAGGAGAGTTTGTAG	60

نتایج

بررسی زنده‌مانی سلول: سلول‌های راجی کشت شده پس از ۴۸ ساعت با روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۵۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو با رقت ۰/۲۵ درصد مخلوط شده و پس از ۵ دقیقه سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شد. نتیجه رنگ‌آمیزی سلول‌های راجی با این روش برای سلول‌هایی که به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت سلولی قرار داشته‌اند در شکل ۱ نشان داده شده است.

آزمایش MTT: نتایج آزمایش MTT در زمانهای ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت با TQ نشان می‌دهد که میزان رشد و تکثیر سلول‌های راجی کاهش یافته است. مقدار این کاهش علاوه بر وابستگی به زمان، ماهیت وابستگی به غلظت TQ نیز دارد، بطوریکه با گذشت زمان غلظت مورد نیاز برای رسیدن به IC50 کاهش می‌یابد. مقادیر غلظت و زمان آزمایش MTT و ارقام محاسبه شده در جدول ۲ نشان داده شده است. در جدول ۲ منظور از کنترل این است که در ابتدای آزمایش بدون انجام انکوباسیون آزمایش MTT انجام شده و جذب نوری چاهک‌ها نسبت به آن سنجیده می‌شود. بعنوان مثال، برای زمان ۲۴ ساعت میانگین OD محاسبه شده برای هر یک از غلظت‌ها، نسبت به عدد 0.23 سنجیده شده که این عدد میانگین جذب نوری چاهک‌هایی است که بعنوان کنترل برای زمان تیمار ۲۴ ساعت در نظر گرفته شده است. کاهش درصد رشد سلول‌ها که متناسب با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون است در جدول ۲ نشان داده شده است.

منحنی پاسخ دوز: مقادیر IC50 (half maximal inhibitory concentration) با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شده و برای رسم منحنی پاسخ دوز در این نرم افزار درصد رشد نسبت به کنترل در محور Yها و رقتهای مختلف TQ هر سری از چاهک‌های تیمار شده در محور Xها قرار می‌گیرد. منحنی پاسخ دوز پس از انجام تست MTT بصورت شکل ۲ رسم می‌شود. با توجه به منحنی شکل ۲ مقدار IC50 برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۴۲۰، ۳۴۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد می‌شود. این مقادیر نشان می‌دهد که اثر TQ در مهار رشد سلول‌های راجی وابسته به زمان است. غلظت‌های ۳۴۰ و ۳۰۰ میکروگرم در مدت زمان ۲۴ ساعت توان مهار رشد به میزان ۵۰ درصد را ندارند و برای رسیدن به IC50 نیاز به زمان بیشتری است. مقادیر بدست آمده وابستگی اثر ممانعت از رشد به غلظت را نیز نشان می‌دهد.

فلوسایتومتری: سلول‌های راجی تیمار شده با غلظت ثابت ٤٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر TQ در سه روز متوالی (٢٤، ٤٨ و٧٢ ساعت) مورد بررسی فلوسایتومتری قرار گرفت و از سلول‌های راجی بدون تیمار با TQ بعنوان کنترل استفاده شد. نتایج بررسی فلوسایتومتری با استفاده از کیت Annexin V-FITC/PI در ساعات صفر (و یا کنترل)، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت بصورت منحنی نقطه‌ای در شکل ٣ نشان داده شده است. در منحنی فلوسایتومتری بدست آمده برای سلول‌های کنترل (شکل ٣، A) اغلب سلول‌ها زنده هستند و تراکم در منطقه Q3 بسیار زیاد است. درصد کمی از سلول‌ها نیز در منطقهٔ Q1، Q2 و Q4 قرار گرفته‌اند. با گذشت زمان ٢٤ ساعت تیمار با TQ، تعدادی از سلول‌ها وارد مراحل مختلف آپوپتوز و یا نکروز می‌شوند (شکل ٣، B). در منحنی بدست آمده پس از ٤٨ ساعت (شکل ٣، C) پراکنش سلول‌ها در چهار قسمت منحنی بیشتر شده و در منحنی بدست آمده پس از ٧٢ ساعت (شکل ٣، D) سلول‌ها بطور مطلوب در مناطق Q1 تا Q4 تفکیک شده‌اند. مقادیر بدست آمده از بررسی فلوسایتومتری بصورت SD ± میانگین سه تکرار ($P < 0.05$) محاسبه شده و در جدول ٣ نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌شود، درصد سلولهای زنده پس از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت از٨٦/٦ به ترتیب به ٤٨/٣، ٣٩/١ و ٢٧/٩ کاهش یافته است. افزایش درصد سلول‌هایی که وارد مراحل آپوپتوز و یا نکروز شده‌اند نسبت به کنترل نیز در جدول ٣ نشان داده شده است.

RT-PCR: محاسبات RT-PCR بر مبنای سیکل آستانه (cycle threshold) صورت می‌گیرد. زمانی که cDNA آماده شده همراه با پرایمرهای طراحی شده در شرایط انجام PCR در دستگاه قرار می‌گیرد، با اتصال پرایمر به توالی مکمل خود بر روی cDNA رونویسی آغاز می‌شود. پس از پایان اولین رونوشت از ژن مورد نظر پرایمر از cDNA جدا شده و سیکل دوم رونویسی را شروع می‌کند. نوکلوتیدهایی که در شرایط آزمایش برای تکثیر ژن در اختیار پرایمر قرار دارند دارای نشانگر فلورسانس هستند و زمانی که در توالی‌های ژن تکثیر شده قرار می‌گیرند، میزان فلورسانس توسط دستگاه ثبت می‌شود. با تکرار سیکل‌های PCR تعداد نوکلئوتیدهای بیشتری استفاده می‌شود و میزان فلورسانس ثبت شده توسط دستگاه افزایش می‌یابد. منحنی PCR میزان افزایش فلورسانش در مقابل شماره سیکل تکرار رونویسی را نشان می‌دهد. در ابتدای آزمایش که میزان ثبت فلورسانس توسط دستگاه کم است، منحنی افزایش فلورسانس بصورت خطی و موازی با محور X ویا محور شماره سیکل است. با تکرار چند سیکل، میزان فلورسانس افزایش می‌یابد و منحنی به شکل صعودی ثبت می‌شود. در نهایت با مصرف نوکلئوتیدهای نشاندار که در محیط آزمایش قرار دارند میزان رونویسی ژن کاهش یافته و منحنی با حالت موازی با محور X رسم می‌شود. سیکلی از آزمایش که ثبت منحنی فلورسانس بطور واضح به حالت صعودی است، سیکل آستانه نامیده می‌شود که معمولا از سیکل ٢٠ به بعد رخ می‌دهد. پس از انجام RT-PCR برای سلول‌های تیمار شده با TQ، نتایج در جدول ٤ ثبت گردید. با استفاده از مقادیر بدست آمده CTها یا آستانه سیکل‌های PCR مقادیر Δct و $\Delta\Delta ct$ محاسبه می‌شود و در نهایت مقدار چند برابر شدن بیان ژن (folding change) از رابطه‌ی ($F. change = 2^{-\Delta\Delta ct}$) بدست می‌آید. Δct برابر است با تفاضل ct ژن مورد نظر از ct ژن *GAPDH*. در این مطالعه آزمایش PCR دوبار انجام شده و از میانگین ct برای هر ژن استفاده شده است. میانگین ct برای ژن *c-Myc* در جدول برابر با ٣٥/٦٥ و برای ژن *GAPDH* برابر با ٢٨/٩٧ است. بنابراین Δct برای سلول‌های تیمار شده با TQ برابر است با:

$\Delta ct\ T = ۳۵/۶۵ - ۲۸/۹۷ = ۶/۶۸$

و همچنین Δct برای سلول‌های بدون تیمار (کنترل) برابر است با: $\Delta ct\ C = ۲۸/۶۳ - ۲۲/۳ = ۶/۳۳$

برای محاسبه F.change ابتدا باید ΔΔct محاسبه شود که عبارت است از تفاضل Δct کنترل از Δct ژن مورد نظر. ΔΔct برای ژن *c-Myc* عبارت است از:

$\Delta\Delta ct = \Delta ct\ T - \Delta ct\ C$

$\Delta\Delta ct = ۶/۶۸ - ۶/۳۳ = ۰/۳۵$

$c\text{-}Myc\ F.\ change = ۲^{-۰/۳۵} = ۰/۷۸$

مقدار folding change میزان تغییر بیان ژن را نشان می‌دهد. اگر این مقدار برابر ۱ باشد، به مفهوم عدم تغییر بیان ژن نسبت به کنترل است. مقادیر کمتر از ۱ کاهش بیان و مقادیر بیشتر از ۱ افزایش بیان ژن را نشان می‌دهد. در اینجا میزان بیان ژن *c-Myc* نسبت به کنترل تحت اثر TQ ۲۲درصد (۰/۲۲ = ۰/۷۸ - ۱) کاهش نشان می‌دهد.

جدول ۲- درصد رشد سلول‌های راجی تیمار شده با غلظت‌های مختلف تایموکوئینون (میکروگرم) در مقایسه با کنترل برای انکوباسیون ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت ($p < ۰/۰۵$)

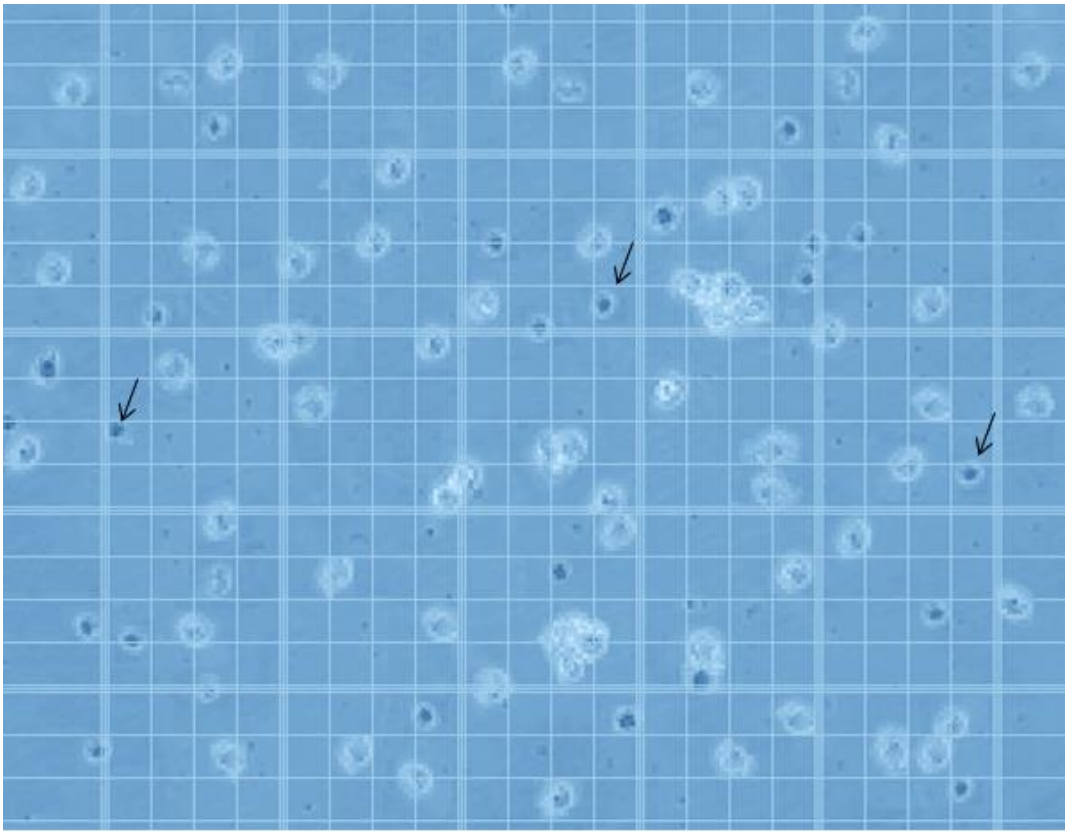
رقت‌های TQ	کنترل	صفر	۲۰۰	٤۰۰	٦۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰
			۲٤ ساعت				
میانگین OD	۰/۲۳	۰/۲۱	۰/۱۷	۰/۱۲	۰/۰۹	۰/۰٦	۰/۰۳
درصد رشد نسبت به کنترل	-	۹۱	۷٤	۵۲	۳۹	۲٦	۱۳
			٤۸ ساعت				
میانگین OD	۰/۳۱	۰/۲۸	۰/۲۱	۰/۱۳	۰/۰۸	۰/۰٦	۰/۰۳
درصد رشد نسبت به کنترل	-	۹۰	٦۷	٤۲	۲۵	۱۹	۱۰
			۷۲ ساعت				
میانگین OD	۰/۲۹	۰/۲٦	۰/۱۹	۰/۱۱	۰/۰٦	۰/۰۲	۰/۰۱
درصد رشد نسبت به کنترل	-	۸۹	٦۵	۳۷	۲۱	٦	۳

جدول ۳- درصد سلول‌های متأثر از Annexin V که با فلوسایتومتری بررسی شده است."SD± میانگین" سه تکرار ($p < ۰/۰۵$)

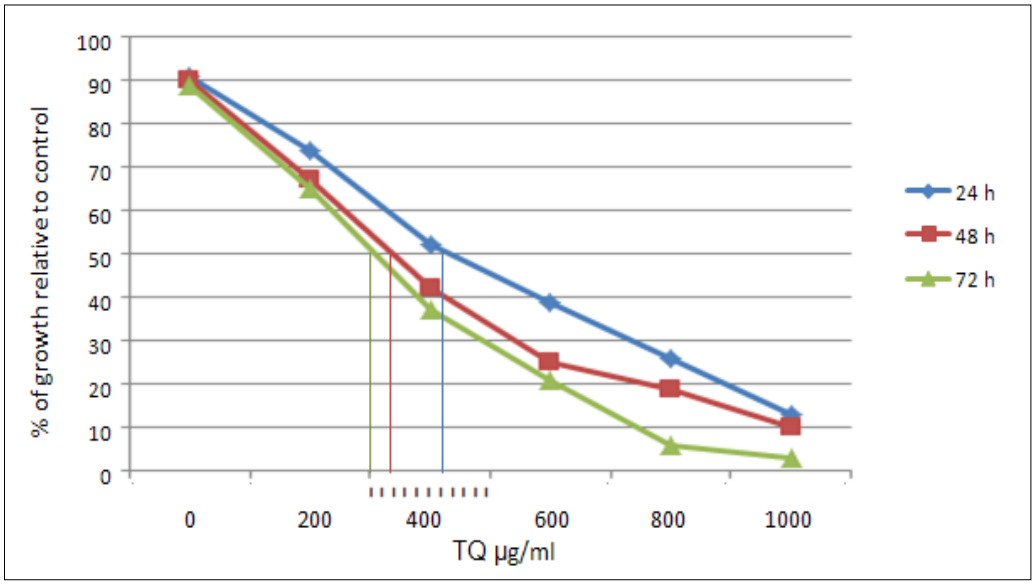
	کنترل	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت
زنده (Q3)	۸٦/٦	٤۸/۳	۳۹/۱	۲۷/۹
آپوپتوز اولیه (Q4)	۱/۷	۱۱/۸	۱۳/۲	۱۵/٤
آپوپتوز تاخیری (Q2)	٤/۹	۱۷/۵	۲۱/۷	۲۵/٦
نکروز شده (Q1)	٦/۸	۲۲/٤	۲٦	۳۱/۱

جدول ٤- مقادیر عددی CT (cycle threshold) برای ژن‌ها در سلول‌های تیمار شده با تایموکوئینون

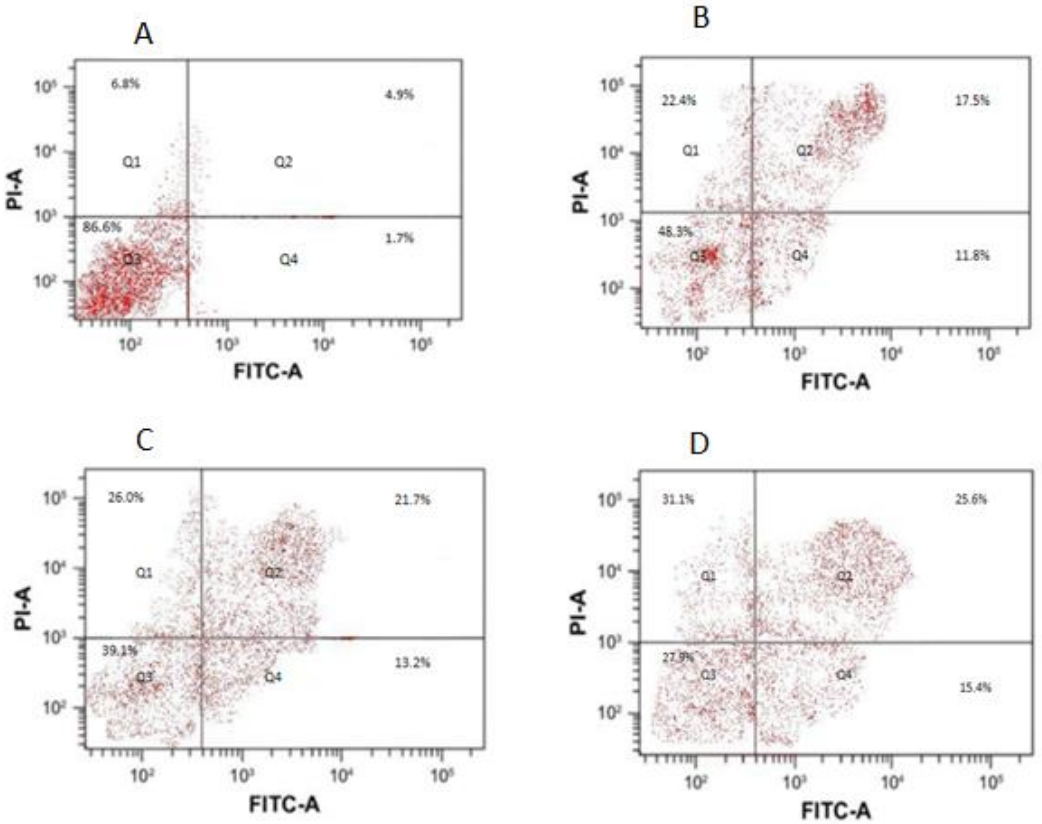
ژن	نمونه	CT	تکرار CT	میانگین CT	Δct	ΔΔct	F.change
GAPDH	تایموکوئینون	۲۸	۲۹/۵۹	۲۸/۷۹			
GAPDH	کنترل	۲۳/۳۸	۲۱/۲۲	۲۲/۳			
c-Myc	تایموکوئینون	۳۵/٦	۳۵/۷	۳۵/٦۵	٦/٦۸	۰/۳۵	۰/۷۸
c-Myc	کنترل	۲۸/۲۱	۲۹/۰٦	۲۸/٦۳	٦/۳۳	۰	۱



شکل ۱- رنگ‌آمیزی تریپان بلو، سلول‌های راجی پس از کشت ۴۸ ساعته. پیکان‌ها سلول‌های مرده و رنگ گرفته را نشان می-دهند.



شکل ۲- منحنی پاسخ دوز (اثر غلظت‌های مختلف تایموکوئینون) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های راجی



شکل ۳- منحنی نقطه‌ای فلوسایتومتری سلول‌های راجی تیمار شده با۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر TQ در زمان‌های مختلف. Q1= necrosis, Q2=late apoptosis, Q3= -viable, Q4=early apoptosis. A ساعت صفر بدون تیمار با تایموکوئینون، B تیمار با تایموکوئینون به مدت ۲۴ ساعت، C تیمار با تایموکوئینون به مدت ۴۸ ساعت و D تیمار با تایموکوئینون به مدت ۷۲ ساعت

بحث

در سال ۲۰۰۸ میلادی مطالعه‌ای برای تعیین غلظت LD50 (lethal Dose 50) TQ یا میزان تایموکوئینون که موجب کشته شدن ۵۰ درصد از موش‌ها و رت-های آزمایشگاهی می‌شود انجام شد. میزان TQ استفاده شده در تزریق داخل صفاقی، به ترتیب ۱۰۴/۷ و ۵۷/۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن برای موش‌ها و رت‌های آزمایشگاهی و در تجویز خوراکی به ترتیب ۸۷۰/۹ و ۷۹۴/۳ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن تعیین گردید. مقادیر بدست آمده در حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ برابر بیشتر از میزان TQ استفاده شده در بررسی‌های خواص ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان و ضد سرطانی این ماده است. در شمار زیادی از مطالعات جانوری مصرف خوراکی TQ در محدوده ۱۰۰ – ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بدون هیچگونه سمیت و یا تلفات گزارش شده است (۱).

در سال ۲۰۰۹ میلادی اثر TQ بر روی سلول‌های سرطانی پانکراس مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از رده سلول‌های اپیتلیال پانکراس سالم انسان نیز بعنوان کنترل استفاده شد. این مطالعه نشان داد که TQ تا ۷۰ درصد موجب مهار زنده‌مانی سلول‌های بدخیم پانکراس شده در حالی که بر روی سلول‌های سالم که به عنوان کنترل آزمایش شده بود تنها به صورت جزئی و محدود اثر داشت. همچنین TQ موجب افزایش حساسیت سلول‌های بدخیم پانکراس به داروهای شیمی‌درمانی می‌شود. بطوریکه تیمار سلول‌های بدخیم با یکی از داروهای شیمی‌درمانی

gemcitabine یا oxaliplatin به تنهایی موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی پانکراس به میزان ۵۰ – ۱۵ درصد می‌شود. در حالی که در استفاده از این داروها همراه با TQ این میزان به ۸۰ – ۶۵ درصد می‌رسد (۳).

در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۷ میلادی اثرات ضد تومور TQ مورد بررسی قرار گرفت. این اثرات شامل القای آپوپتوز از طریق صدمات اکسیداتیو به DNA سلول، کاهش مقاومت به شیمی‌درمانی بواسطه خاصیت آنتی اکسیدان و هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالینگ کارسینوژنیک است (۱۳).

در رده سلول‌های سرطانی پروستات، DU145 و C4-2B، ترکیب TQ با داروی شیمی درمانی Docetaxel موجب القای آپوپتوز از طریق مهار مسیر بیوشیمیایی PI3K/AKT Signaling می‌شود. داروی Docetaxel (DTX) با ممانعت از دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها تقسیم میتوتیک سلول را متوقف می‌سازد. استفاده از TQ و یا DTX بطور مجزا موجب توقف رشد سلول‌های تومور می‌شود اما استفاده از ترکیب TQ و DTX با هم اثر القای آپوپتوز را افزایش می‌دهد بطوری که غلظت استفاده شده از مجموع غلظت‌های دو عامل به تنهایی، کمتر است (۲۷).

در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۱ میلادی در مورد کودکان مبتلا به بتا تالاسمی ماژور نشان داده شده که استفاده از پودر سیاه‌دانه به میزان ۲ گرم در روز همراه با غذا و نوشیدنی‌ها به مدت ۳ ماه موجب تقویت سیستم ایمنی و افزایش گلبول‌های سفید می‌شود (۱۰).

در این مطالعه نیز مجاورت سلول‌های راجی با غلظت ثابت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر TQ موجب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های زنده می‌شود و به درجاتی متناسب با زمان تیمار، سلول‌ها وارد مرحله آپوپتوز می‌شوند. درصد سلول‌هایی که تحت اثر TQ وارد مرحله آپوپتوز شده‌اند قابل توجه است. اثر ممانعت از رشد وابسته به زمان است. ژن *c-MYC* مهمترین ژنی که در لنفوم بورکیت با افزایش بیان چندین برابر ایجاد بیماری می‌نماید در شرایط این مطالعه تحت اثر TQ به میزان ۲۲ درصد کاهش بیان نشان می‌دهد. غلظت TQ استفاده شده در این مطالعه در مقیاس میکروگرم در میلی‌لیتر است که در مقایسه با غلظت‌های میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شده در اندازه‌گیری‌های LD50 به مقدار قابل توجهی کمتر است. بنابراین استفاده مقدار مؤثر بعنوان مکمل داروئی می‌تواند از ایمنی لازم برخوردار باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر و مطالعاتی که در گذشته در مورد تایموکوئینون انجام شده، اثرات مثبت این ماده در ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی را نشان می‌دهد. اغلب این مطالعات در حالت برون‌تنی و یا آزمایش بر روی جانوران آزمایشگاهی است. بررسی اثرات این ماده در مطالعات انسانی نیازمند تعیین ADME (Absorption, distribution, metabolism and excretion) است و باید سمیت، میزان جذب و توزیع دربدن، متابولیسم و دفع آن مشخص شود. پس از تعیین و تأیید ADME ماده مورد نظر می‌تواند وارد مرحله آزمایش‌های بالینی شود. به هر حال باتوجه به اینکه تایموکوئینون موجب کاهش رشد سلول‌های راجی می‌شود میتواند بعنوان یک مکمل در کاهش عوارض ناشی از بیماری لنفوم بورکیت و داروهای شیمی درمانی در درمان این بیماری مد نظر باشد.

منابع

1-Abukhader M.M. 2013. Thymoquinone in the clinical treatment of cancer: Fact or fiction? *Pharmacognosy Reviews*, 7(14): 117-120.

2- Adhikary S., Eilers M. 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Molecular Cell Biology*, 6(8):635- 645.

3- Banerjee S., Kaseb A.O., Wang Z., Kong D., Mohammad M., Padhye S., Sarkar F.H., Mohammad R.M. 2009. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 69(13):5575-5583.

4- Beaulieu M.E., Castillo F., Soucek L. 2020. Structural and Biophysical Insights into the Function of the Intrinsically Disordered Myc Oncoprotein. *Cells*, 9(1038):1-27.

5- Burkitt D.P. 1983. The discovery of Burkitt's lymphoma. *Cancer*, 51(10):1777-86.

6- Burkitt D.P. 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *The British Journal of Surgery*, 46(197):218-223.

7- Caponetti G., Bagg A. 2017. Demystifying the diagnosis and classification of lymphoma: a hematologist/oncologist's guide to the hematopathologist's galaxy. *Journal of Community and Supportive Oncology*, 15(1):43-48.

8- Chen H., Liu H., Qing G., 2018. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(5):1-7.

9- Gilani A., Jabeen Q., Ullah Khan M. 2004. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal* of *Biological Sciences*, 7: 441-451.

10- Hannan A., Rahman A., Sohag A.A., Uddin J., Dash R., Sikder M.H., Rahman S., Timalsina B., Munni Y.A., Sarker P.P., Alam M., Mohibbullah M., Haque N., Jahan I. Hossain T., Afrin T., Rahman M., Arif T.U., Mitra S., Oktaviani D.F., Khan K., Choi H.J., Moon I. Kim B. 2021. Black Cumin (*Nigella sativa L.*): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients*, 13(6):1784.

11- Hu H.M., Kanda K., Zhang L., Boxer L.M. 2007. Activation of the *c-Myc* p1 promoter in Burkitt's lymphoma by the hs3 immunoglobulin heavy-chain gene enhancer. *Leukemia*, 21(4):747-753.

12- Kalkat M., Resetca D., Lourenco C., Chan P., Wei Y., 2018. MYC Protein Interactome profiling reveals functionally distinct regions that cooperate to drive tumorigenesis. *Molecular Cell*, 72(5):836-848.

13- Khan A., Tania M., Fu S., Fu J. 2017. Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. *Oncotarget*, 8(31): 51907-51919.

14– Lewis D.W., Lilly S., Jones K.L. 2020. Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 101(1):34-41.

15- Ling Yong, CL., Wei Ow D.S., Tandiono T., Mei Heng L.L., Keung Chan K.K., Dieter Ohl C., Klaseboer E., Wan Ohl S., Hwa Choo A.B. 2014. Microbubble-mediated sonoporation for highly efficient transfection of recalcitrant human B- cell lines. *Biotechnology Journal*, 9(8):1081-1087.

16- Meerloo J.V., Kaspers G.J.L., Cloos J. 2015. Cell sensitivity assays: The MTT assay. Methods in Molecular Biology. Springer Ukraine, *MIMB*, (731): 237-244.

17- Misteli T. 2011. The inner life of the genome. *HHS Author Manuscripts*, 304(2): 66-73.

18- Mugnaini E.N., Ghosh N. 2016. Lymphoma. Prim Care. *Lymphoma Research Gate*, 43(4):661-675.

19- Nickavar B., Mojab F., Amoli M. 2003. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa L*. from Iran. *National Library of Medicine*, 58(9/10):629-631.

20- Padhye S., Banerjee S., Ahmad A., Mohammad R., Sarkar F.H. 2008. From here to eternity-the secret of Pharaohs: Therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. *Cancer Therapy*, 6(b):495-510.

21- Potre O., Pescaru M., Sima A., Ionita L., Tudor R., Borsi E., Samfireag M., Potre C. 2021. Evaluation of the Relapse Risk and Survival Rate in Patients with Hodgkin Lymphoma: A Monocentric Experience. *Medicina (Kaunas)*, 57(10): 1026.

22- Pourbakhsh H., Taghiabadi E., Abnous K., Hariri A.T., Hosseini S.M., Hosseinzadeh H. 2014. Effect of *Nigella sativa* fixed oil on ethanol toxicity in rats. *Iran Journal Basic Medicine*, 17(12):1020-31.

23- Pulvertaft, R.J.V. 1965. A study of malignant tumours in Nigeria by short-term tissue culture. *Journal of Clinical Pathology*, 18(3):261-273.

24- Rieger A.M., Nelson K.L., Konowalchuk J.D., Barreda, D.R. 2011. Modified annexin v/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*, 24(50):2597.

25- Roix J.J., McQueen P.G., Munson P.J., Parada L.A., Misteli T. 2003. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature Genetics*, 34(3):287-291.

26- Schmitz R., Ceribelli M., Pittaluga S., Wright G., Staudt L.M., 2014. Oncogenic Mechanisms in Burkitt Lymphoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(2):a014282.

27- Singh S.K., Apata T., Gordetsky J.B., Singh R., 2019. Docetaxel Combined with Thymoquinone Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells via Inhibition of the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cancers*, 11(1390):1-13.

28- Wasylishen A., Penn L.Z. 2010. Myc The Beauty and the Beast. *Genes Cancer*, 1(6):532-541.

29- Yu Z., Wang R., Fok W.C., Cloes A., Salmon A.B., Perez V.I. 2015. Rapamycin and Dietary Restriction Induce Metabolically Distinctive Changes in Mouse Liver. *Journals of Gerontology: Biological Sciences*, 70(4):410-420.

Anti-proliferative Effect of Thymoquinone on Raji Cell Line in Burkitt's Lymphoma

Morteza Davoodi[1], Shahriyar Saeediyan[1], Reza Saghiri[2*], Zahra Zamani[2], Gholamreza Bakhshi Khaniki[3]

1- Department of Biochemistry, Payame Noor university, Tehran, Iran
2- Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Department of Plant Sciences, Payame Noor university, Tehran, Iran

Abstract

Medicinal plants are of interest due to their cheapness, accessibility and better acceptance by patients. One of these plants is black seed (*Nigella sativa*). In this study, the anti-proliferative effect of thymoquinone, which is the main component of black seed oil, is investigated on Raji cells. Raji cells are cancerous B lymphocytes that are seen in the germinal centers of Burkitt's lymphoma. In present study, Raji cells were treated with different dilutions of thymoquinone from 0 to 1000 µg/ml and the percentage of living cells was determined by trypan blue method and MTT test. Also, flow cytometry and Annexin V-FITC/PI kit were used to show the percentage of cells in different stages of growth. The expression of c-Myc gene, which is the most important altered gene in the development of Burkitt's lymphoma, was investigated by Real Time-PCR method. Statistical analysis was also done using SPSS 2020 software. This study showed that thymoquinone can inhibit the growth of Raji cells in a concentration-dependent and time-dependent manner. Thymoquinone, while suppressing the expression of c-Myc gene with a significant percentage, causes Raji cells to enter the stage of programmed death or apoptosis, and has the potential to be used as an adjunctive treatment for Burkitt's lymphoma.

Keywords: Burkitt's lymphoma, *Nigella sativa*, Thymoquinone, Raji cells, RT-PCR.