فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هفتم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۴

بررسی خواص ضد سرطانی تاکسول و عصاره‌های الکلی و آبی مریم گلی (*Salvia officinalis*) بر رده سلولی 4T1 استخراج شده از تومورهای پستانی موش BALB/ c

سیدمحمد علی شریعت زاده*، احمد همتا، ملک سلیمانی مهرنجانی، مهری رضائی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

E-mail: shariatzadeh@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۲۰

چکیده

سرطان یکی از بیماری‌های شایع مزمن و غیرواگیر است، سرطان پستان نیز شایعترین سرطان عضو ی در زنان است. که تقریبا ازهرهشت زن یک نفر مبتلا به سرطان پستان می‌باشد. داروهای گیاهی طی قرون متمادی تنها منبع قابل دسترس جهت درمان دردها و آلام بوده‌اند. در عصر حاضر با وجود پیشرفت و توسعه چشمگیر کاربرد داروهای سنتزی، هنوز گیاهان دارویی و اشکال دارویی حاصل از آنها درمقیاس وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله کاربردهای آنها در درمان سرطان است. مطالعه حاضر به بررسی اثرات سایتو توکسیک گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis*) بر رده سلولی4T1 استخراج شده از تومورهای پستانی موش BALB/c پرداخته است.

رده سلولی 4T1 از انسیتوپاستور تهران تهیه گردید و بعد از انتقال به دانشگاه اراک، سلول‌های منجمد در یخ خشک فریز شدند و سپس در محیط کشت RPMI1640 , 10%FBS کشت داده شدند و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور CO2دار قرار داده شدند. از برگ‌های خشک مریم گلی با استفاده از متانول به روش digestion عصاره‌گیری شد. سپس عصاره فیلتر شده و مقداری از آن کنار گذاشته شد و ما بقی آن توسط حلال‌های غیرقطبی هگزان، دی کلرومتان و اتیل استات شستشو داده شد تا مواد غیرقطبی آن جدا شود. در نهایت حلال بـا اسـتفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی حذف شد. از تاکسول و هر یک از عصاره‌های الکلی و آبی ۵ غلظت تهیه شده و روی سلولها اثر داده شدو توانایی زیستی سلول‌ها به دو روش جذب تریپان بلو و رنگ سنجیMTT ارزیابی شد.

نتایج نشان داد که تاکسول و عصاره آبی مریم گلی خواص ضدسرطانی چشمگیری علیه سلول‌های سرطانی پستان دارند. عصاره آبی مریم گلی به وابسته به دوز قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی بوده و مشابه تاکسول دارای خواص سایتوتوکسیک می‌باشد و رده سلولی4T1 به دلیل بالا بودن قدرت متاستاز، مدل مناسبی برای انجام مطالعات در زمینه سرطان پستان است.

کلیدواژه‌ها: مریم گلی، تاکسول، سمیت سلولی، رده سلولی4T1

مقدمه

سرطان یکی از شایعترین و شدیدترین بیماری‌هایی است که در پزشکی بالینی دیده می‌شود. آمار نشان می‌دهد که بیش از یک سوم جمعیت به یکی از اشکال سرطان مبتلا می‌شود. [۲۹] اکثریت سرطان‌ها در انسان از قرار گرفتن وی در معرض عوامل سرطان فیزیکی و شیمیایی ناشی می‌شوند، همچنین در ایجاد سرطان‌ها می‌توان به عوامل ویروسی نیز اشاره کرد [۲٦] . از آن جا که سرطان براساس ریشه در تغییرات بیان یا کارکرد ژن دارد، جای شگفتی نیست که دستاوردهای چندین پژوهش انتشار یافته در سال‌های اخیر، از ایده مداخله مستقیم ریز RNAها در فرآیند تومور زایی حمایت می‌کند. تقریبا ۵۰ درصد ژن‌های ریز RNAهای انسانی شناخته شده در مکانهای ترد (شکننده) و نواحی همراه با سرطان در ژنوم قرار دارند. ریز RNAها می‌توانند نقش‌های آنکوژنی داشته باشند[۷] سرطادرصد ژن پستان شایعترین سرطان عضوی در زنان است[۱٦]. درمطالعه‌ای که توسط پری انجام شده مشخص گردیده که تقریبا ازهرهشت زن یک نفرمبتلابه سرطان پستان می‌باشد[۳۰] از طرفی به علت اینکه پستان‌ها اهمیت هیجانی برای زنان دارد و درمان سرطان پستان ممکن است به برداشتن آن منجر شود، این بیماری ترس و وحشت زیادی را در خانم‌ها بر انگیخته است[۱۲] با توجه به منابع موجود، میزان بروز خام موارد سرطان در کشور ۱۰۰ مورد در صد هزار نفر جمعیت برآورده می‌شود. لذا براساس جمعیت کشور سرطان پستان در زنان همچنان در رتبه اول قرار داشته و با ASR ۲۵/٦۰ بالاتر از موارد گزارش شده سرطان پوست می‌باشد. و پراکندگی استانی نسبتا یکسانی را داشته و در تمامی آنها در صدر موارد سرطانی گزارش شده، قرار دارد به‌جز در اردبیل که پس از معده و مری و پوست جای دارد[۱٤]. علاقه به مواد گیاشیمیایی (phytochemicals) که قابلیت کاهش میزان بروزتعدادی ازتومورها را دارا می‌باشند به‌صورت روزا فزون روبه افزایش است وازاین میان مشتقات غذایی ازاین نظرکه تقریبا غیرسمی می‌باشند موردتوجه خاصی قراردارند. اما شواهد علمی محدودی که دررابطه بامکانیسم عمل این گیاهان وجود دارد از ورود آنها به مسیراصلی مراقبت‌ها و درمان‌های پزشکی جلوگیری می‌کند [۱۷] سازمان بهداشت جهانی (WHO) (Worhd Health Organization) به‌عنوان مرکز سیاستگزاری و نظارت جهانی در امر بهداشت، برای نخستین بار در سال ۱۹۷۸ با صدور اعلامیه آلماآتا خاطر نشان نمود که هنوز بخش عمده‌ای از جامعه بشری به داروهای گیاهی اعتقاد دارند و جهت تامین سلامت عمومی خود از آنها استفاده می‌کنند [٤].

ارزیابی عصاره‌های خام گیاهی به روش‌های in vitro نتایج خوبی در بردارد. از جمله اینکه شامل هزینه‌های کمتری می‌شود و حساسیت بیشتری را دارد، آزمایش در زمان کوتاه قابل انجام است و مقدار نمونه مورد نیاز برای آزمایش کمتر است. البته ترکیبات آنتی تومور زیادی نیز وجود دارند که با تست‌های فوق شناسایی نمی‌شوند چرا که در رقت‌های بالا به حد کافی قدرت نشان دادن اثرات‌شان را ندارند [٦].

گیاه مریم گلی (*Salvia Offisinalis*)که نام‌های گوناگونی را در کشورهای مختلف به خود اختصاص می‌دهد مانند: Sauge در فرانسه و شلبیه (shalbiyah) در زبان عربی [۳٦]، گیاهی است بو ته‌ای به ارتفاع حداکثر ٦۰ سانتیمتر با ریشه چوبی و پایا، ساقه افراشته، انشعابات متعدد، پوشیده ازکرک‌های کوتاه پیچیده، برگ‌های ساده،

دارای پهنک مستطیلی شکل و دمبرگدار [٤]. این گیاه بومی مناطق مدیترانه‌ای و شمال آفریقاست، ندرتا به‌صورت خودرو یافت می‌شود و در سراسر اروپا درباغ‌ها و باغچه‌ها کاشته می‌شود، در ایران نیز به‌صورت کاشته شده وجود داد [۵]. درحال حاضر جنس مریم گلی در ایران ۵۸ گونه دارد که ۱۷ گونه آن بومی ایران هستند [۱]. این گیاه با ارزش‌ترین نوع دارویی تیره نعناع و دارای اختصاصات درمانی مهم با اثر قاطع است [۳] که شاید بتوان خواص آنتی اکسیدانی[۲۲] و ضد سرطانی آن را مورد توجه قرار داد. براساس نظریات داروین دال بر مشابهت بین انسان وحیوان که به‌عنوان یک پایه منطقی برای استفاده از حیوانات به‌عنوان الگویی برای انسان در نظر گرفته شد و همچنین پیشرفت در زمینه میکروب‌شناسی تاثیر بسزایی در افزایش استفاده از حیوانات داشت [۳۲-۲۰]. با توجه به این که عوامل متعددی در ایجاد سرطان نقش دارند و سرطان یک بیماری پیچیده محسوب می‌شود. یافتن مدل مناسب آزمایشگاهی که بتوان از طریق آن به درمان انسانی پرداخت در صدر فعایت‌های محققان در سراسر جهان قرار گرفته است.

موش‌های‌نژاد BALB/C موشی زال است که در سال ۱۹۲۰ در آزمایشگاه برد - استرین در شهر نیویورک از موش خانگی ایجاد شد[۱۰] رده سلولی تومور پستان 4T1 استخراجی از موش BALB/C نمونه مناسبی برای بررسی invitro می‌باشد. [۸] در این پژوهش ما از رده سلولی 4T1 استفاده می‌کنیم، که دارای قدرت متاستاز بسیار بالایی می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک الگو برای مطالعه داروهای ضد سرطان بکار رود. با بررسی داده‌های به‌دست آمده از این مطالعه به این موضوع پی خواهیم برد که آیا رده‌های سلولی می‌توانند مدل جایگزین مناسبی برای مدل انسانی باشند؟ و آیا عصاره‌های الکلی و آبی (فاقد عوامل غیرقطبی) مریم گلی قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی هستند؟ و اگر این‌گونه‌است میزان اثربخشی آنها در مقایسه با داروی متداول تاکسول به میزان است؟

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا رده سلولی 4T1 را از بانک سلولی انسیتو پاستو تهران خریداری نمودیم و در مجاورت یخ خشک به مدت ٤ ساعت به آزمایشگاه کشت سلول دانشگاه اراک منتقل کردیم. سپس سلول‌ها را براساس پروتکول دفریز نمودیم و پس از ٢٤ ساعت، انجام پا ساژ سلولی را انجام دادیم بعد از پاساژ سلولی آنها را در انکوباتور co_2 دار قرار دادیم. بعد ازچند مرحله پاساژ دادن سلول‌ها، آنها را با عصاره‌های گیاهی متانلی و آبی مریم گلی و سپس با تاکسول تیمار دادیم ودر انتها از ترکیب عصاره و تاکسول استفاده کردیم و سپس به بررسی اثر مواد فوق‌الذکر بر توان زیستی سلول‌ها از طریق رنگ آمیزی تریپان بلو، سنجش تترازولیوم (MTT) و از طریق رنگ آمیزی فلورسنس به بررسی تغییرات مورفولوژیک پرداختیم و پس از ثبت نتایج آنها را مورد آنالیز و تجزیه و تحلیل قرار دادیم.

ذوب کردن سلول‌ها

ویال‌های سلولی را به‌صورت زیر ذوب نمودیم:

ویال سلولی را که در یخ خشک بود برداشته و آرام انتهای ویال را وارد بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد نموده (دقت شود فقط انتهای ویال در آب قرار بگیرد)، به آرامی حرکت می‌دهیم تا کم کم ذوب شود. سپس ویال را به زیر هود انتقال داده و محتویات ویال را در زیر هود به فلاسک سلولی منتقل نموده و ۵ میلی لیترمحیط کشت

RPMI سرم‌دار (۱۰ درصد) به آن اضافه نموده و در انکوباتور CO_2 قرار می‌دهیم. در این روش از سانتریفیوژ استفاده نشده و بعد از ۲٤ ساعت محیط کشت فلاسک تعویض شد.

تهیه عصاره‌های گیاهی

حدود ۳ کیلوگرم برگ و سر شاخه‌های تازه گیاه مریم گلی از مزرعه دانشکده کشاورزی اراک در خردادماه سال ۸۹ چیده شده ودر محیطی خنک و به دور از نور آفتاب خشک شد. سپس حدود ۵۰۰ گرم برگ خشک مریم گلی آسیاب و غربال شد تا پودر یک‌دستی حاصل شود. ۱۰۰ گرم از پودر در ارلن ریخته شد و حدود ۲۵۰میلی لیتر متانول خالص (Dr. Mojalali، ایران) به آن افزوده شد وبه مدت ۲٤ ساعت روی شیکر با دمای ٤۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد قرارداده شد. سپس مخلوط به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی صاف شد و عصاره به‌دست آمده در یک ظرف دردار شیشه‌ای ریخته شد و درجایی دور از نور نگهداری شد. مجدداً روی تفاله باقی مانده ۲۵۰ میلی لیتر متانول خالص ریخته شد و ظرف حاوی تفاله مجدداً به مدت ۲٤ ساعت روی شیکر با دمای ٤۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مقدار مورد نیاز از عصاره متانلی برداشته شد و بقیه آن در دستگاه تبخیر کننده چرخشی قرار گرفت تا حلال آن کاملاً تبخیر شده و رسوب آن باقی بماند. روی رسوب حاصله ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر (حاوی ۵ تا ۱۰ درصد متانول به منظور کمک به انحلال رسوب) ریخته شد و پس از حل کردن رسوبات ظرف، ظرف محتوی مخلوط به مدت ۲٤ ساعت در یخچال قرار داده شد. بعد از گذشت ۲٤ ساعت ظرف از یخچال خارج شده و بلافاصله با کاغذ صافی صاف شد. برای بررسی نقش ضد سرطانی ترکیبات قطبی و محلول در آب مریم گلی، عصاره به‌دست آمده با استفاده از ۳ حلال هگزان، دی کلرو متان و اتیل استات (Merck، آلمان) (که قادر به جدا نمودن ترکیبات غیرقطبی می‌باشند) شستشو داده شد و تفاله حاصل به‌عنوان عصاره حاوی ترکیبات قطبی مورد استفاده قرار گرفت. با قرار دادن ظرف حاوی عصاره آبی در حمام آب گرم حلال آن تبخیر شده و رسوب خشکی بر جای ماند. با حل کردن مقدار مورد نیاز از هریک از پودرهای حاصله از عصاره‌ها در محیط کشت) RPMI) فاقد سرم و گذراندن آن از فیلتر (milipore) با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر، توانستیم غلظت‌های مورد نیاز عصاره‌ها را تهیه کنیم و تا زمان استفاذه در یخچال قرار داده و برای مدت طولانی‌تر در فریزر نگهداری شد.

تعیین سمیت سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو

پس از این که چند مرحله سلول‌ها پاساژ داده شدند، تعداد^{٦}۱۰×۱ سلول درهرویال پلیت ٦ خانه کشت داده شد، به هر خانه ۱/۵ تا۲ میلی لیتر محیط کشت (FBS10% RPMI1640) اضافه گردید، به منظور اتصال سلول‌ها به کف پلیت، پلیت به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور CO_2دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها خارج و محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ نانومول بر لیتر از تاکسول (Ebewepharma اتریش)به هر چاهک اضافه شده و پلیت به انکوباتوربرای مدت ۲٤ ساعت منتقل شد، پس از ۲٤ ساعت تمام خانه‌های پلیت تریپسین زنی شد. سپس با افزودن محیط کشت کامل (FBS10%)، تریپسین غیرفعال شده و به نسبت۱: ۱ تریپان بلو ۰/٤ درصد (Sigma، آلمان) به هر خانه اضافه شد. پلیت به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد. با

استفاده از لام نئوبار (خانه‌های متعلق به شمارش گلبول‌های سفید) شمارش سلوله صورت گرفت. سلول‌های آبی رنگ به‌عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های بی‌رنگ به‌عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فرمول زیر، در صد حیات سلول‌ها در غلظت‌های مختلف محاسبه گشت.

$$\text{توانایی زیستی سلول‌ها} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} \times ۱۰۰$$

سنجش تترازولیوم (MTT)

این تکنیک بر پایه توانایی آنزیم‌های دهیدرو ژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده در شکستن حلقه‌های تترازولیوم MTT زرد رنگ و ایجاد کریستال‌های بنفش فورمازان (که تا حد زیادی توانایی عبور از غشاء پلاسمایی را ندارند) استوار است. میزان کریستال‌های فورمازان تولید شده، قابلیت حیات و همچنین تعداد سلول‌های زنده را مشخص می‌کند. برای انجام این تست تعداد $۱۰^{٤}$ سلول در هرچاهک پلیت ۹۶ خانه کشت شده و به مدت ۲٤ ساعت در انکو باتور قرار داده شد، سپس محیط رویی خارج و هر چاهک ۲ بار توسط PBS^{-} شسته شده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت‌های ۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ نانومول بر لیتر از تاکسول به هر چاهک پلیت اضافه شده به مدت ۲٤ ساعت پلیت انکوبه شد. پس از سپری شدن ۲٤ ساعت محیط چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه فاقد سرم تعویض گردیده وبه هریک از چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma، آلمان) (۵ mg/ml)اضافه شد و به مدت ٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس محیط رویی هر چاهک تخلیه شد. برای انحلال و استخراج رسوب فورمازان تولید شده به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفاکساید DMSO اضافه گردید ودر دمای اتاق ودر مکانی تاریک قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک پلیت به چاهک خالی مجاور منتقل گردیدو جذب نوری (OD) هر چاهک در طول موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA-reader قرائت شد و درصد حیات سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر، در مورد هر غلظت محاسبه گردید.

$$\text{توانایی زیستی سلول‌ها} = \frac{\text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل}} \times ۱۰۰$$

تمامی مراحل فوق برای عصاره الکلی (با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و عصاره آبی فاقد عوامل غیرقطبی (با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ٤۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)تکرار شده و نتایج ثبت گردید.

آنالیز آماری داده‌ها

برای بررسی اثر سیتوتوکسیک مریم گلی برتوانایی زیستی سلول‌های سرطان پستان موش (4T1) از روش آماری آنالیز دو طرفه و یک طرفه (spss و excel)و با استفاده از تست Duncan مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p\leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایشات بررسی سمیت سلولی

نتایج سنجش توانایی زیستی سلول‌ها بر پایه جذب تریپان بلو

مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از گذشت ۲٤ ساعت اختلاف معناداری میان تمام

گروه‌های تیمار شده با دوزهای مختلف تاکسول، عصارهٔ آبی و عصاره الکلی نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول، عصارهٔ آبی، عصارهٔ الکلی در زمان ٢٤ ساعت که به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو اندازه‌گیری شده است. مقادیر به‌صورت mean± std بوده و تفاوت میانگین‌ها در سطح P<0. 05 معنی‌دار در نظرگرفته شده است. میانگین‌های با کدحرف‌های متفاوت در هر ستون دارای تفاوت معنادار می‌باشند (ANOVA, one way, Duncan test)

ماده / دوز	تاکسول	عصاره آبی	عصاره الکی
۱	$77/05^{a} \pm 6/37$	$84/196^{a} \pm 5/914$	$84/83^{a} \pm 3/172$
۲	$61/86^{a} \pm 548$	$84/896^{a} \pm 3/167$	$84/67^{a} \pm 1/86$
۳	$51/72^{a} \pm 2/33$	$80/49^{a} \pm 0/52$	$81/38^{a} \pm 5/02$
٤	$39/56^{c} \pm 3/16$	$80/00^{a} \pm 0/58$	$68/82^{b} \pm 2/22$
٥	$29/22^{cd} \pm 9/92$	$52/38^{b} \pm 1/797$	$46/99^{c} \pm 2/44$
٦	$25/74^{d} \pm 7/46$	$43/486^{c} \pm 4/68$	$30/19^{d} \pm 1/22$

در جدول فوق ردیف اول از هر ستون کنترل در نظر گرفته شده وردیف‌های ۲ تا ٦ برای هر یک از ستون‌های مذکور به ترتیب به شرح زیر است:

به ترتیب در ستون تاکسول دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ نانومول بر لیتر از تاکسول، در ستون عصاره آبی دوزهای ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ٤۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی فاقد عوامل غیرقطبی ودر ستون عصاره الکلی دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره الکلی.

براساس این نتایج غلظتی که بتواند رشد سلول‌ها را ۵۰ درصد مهار کند (IC50) برای هر یک از ترکیبات مذکور بدین شرح بود:

- ✓ تاکسول: دوز ۳/۵ نانومول بر لیتر.
- ✓ عصاره الکلی: دوز ۷۰٤/۱۷میکروگرم بر میلی‌لیتر.
- ✓ عصاره آبی: در بررسی اثر عصاره آبی با افزایش دوز از ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به بالا قابلیت حیات سلول‌ها کاهش قابل ملاحظه و معناداری پیدا کرد. بنابراین سمی‌ترین دوز معادل ٤۱۰۱/۸٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظرگرفته می‌شود.

میانگین زیستی سلول‌های سرطانی در گروه‌های تیمار شده با تاکسول و عصاره الکلی و عصاره آبی نسبت به یکدیگر اختلاف معناداری می‌باشند (Univariate, P<0. 05). این نتایج نشان داد که دوز تیمار و توانایی زیستی سلول‌های سرطانی دارای اثرات متقابل می‌باشد، به‌صورتی‌که با افزایش میزان دوز قابلیت حیات سلول‌ها کاهش معناداری پیدا می‌کند.

نتایج سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روشMTT

از مقایسه داده‌های به دست آمده از سنجش درصد حیات سلول‌های سرطانی تیمار شده با تاکسول،

عصاره آبی و عصاره الکلی، مشخص شد که تفاوت میانگین درصد حیات سلول‌ها در دوزهای متفاوت و زمان ٢٤ ساعت در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح (P<0. 05) معنادار بود.

میانگین زیستی سلول‌های سرطانی در گروه‌های تیمار شده با تاکسول، عصاره الکلی و عصاره آبی نسبت به یکدیگر اختلاف معناداری دارند، (Univariate, P<0. 05)

جدول ۲. مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول، عصارهٔ آبی و عصارهٔ الکلی در زمان ٢٤ ساعت که به روش MTT اندازه‌گیری شده است. مقادیر به‌صورت stdmeans ± بوده و تفاوت میانگین‌ها در سطح p<0. 05 معنی‌دار در نظر گرفته شده است. میانگین‌های با کد حروف متفاوت در هر ستون دارای تفاوت معنادار می‌باشند (ANOVA, one way, Duncan test).

ماده / دوز	تاکسول	عصاره آبی	عصاره الکلی
۱	۱۰۰^{a}±۰/۰۰	۱۰۰^{a}±۰/۰۰	۱۰۰^{a}±۰/۰۰
۲	۷۹/۱۹^{b}±۲/۵۸	۸۱/۶۳^{b}±۱۰/۸۶	۹۰/۶۱^{ab}±۵/۲۵
۳	۷۱/۵۴^{c}±۱/۸۱	۵۱/۵۳^{c}±۶/۴۰	۸۰/۲۷^{bc}±۵/۵۲
۴	۵۸/۵۳^{d}±۴/۹۴	۴۵/۶۴^{cd}±۴/۰۱	۷۲/۳۱^{cd}±۸/۵۴
۵	۵۴/۳۶^{de}±۳/۱۸	۴۳/۷۵^{cd}±۳/۵۵	۶۶/۵۷^{d}±۱۳/۰۳۴
۶	۵۲/۸۶^{e}±۲/۴۲	۳۸/۲۳^{d}±۶/۵۱	۵۱/۹۸^{e}±۲/۷۸

در جدول فوق ردیف اول از هر ستون کنترل در نظر گرفته شده و ردیف‌های ۲ تا ٦ برای هریک از ستون‌های مذکور به ترتیب به شرح زیر است:

به ترتیب در ستون تاکسول دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ نانومول بر لیتر از تاکسول، در ستون عصاره آبی دوزهای ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ٤۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی فاقد عوامل غیرقطبی و در ستون عصاره الکلی دوزهای۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره الکلی.

این نتایج همچنین نشان داد که دوز مصرفی دارای اثر متقابل بر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی می‌باشد به این معنا که با افزایش دوز، درصد حیات سلول‌ها به‌صورت معناداری کاهش می‌یابد.

میزان IC50 محاسبه شده برای هریک از ترکیبات مورد استفاده با توجه به بررسی منحنی درجه ۲ به شرح زیر می‌باشد:

- ✓ تاکسول: دوز ۸/۹۷ نانومول بر لیتر.
- ✓ عصاره الکلی: در محدوده ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر.
- ✓ عصاره آبی: با افزایش میزان عصاره از۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به سمت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر قابلیت حیات سلول‌ها کاهش قابل ملاحظه و معناداری پیدا کرد، بنابراین سمی‌ترین دوز عصاره آبی معادل ۲٤۸۲/۵۱ میکروگرم بر میلی لیتر درنظر گرفته شد.

نتایج به دست آمده از بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های سرطانی 4T1 با استفاده از

رنگ‌آمیزی فلورسنس رنگ‌آمیزی سلول‌ها در گروه کنترل و گروه تیمار با دزهای موثر انتخاب شده از عصاره آبی، الکلی، تاکسول، آبی ـ تاکسول و الکلی تاکسول در زمان تیمار ٢٤ ساعته، ٢ بار تکرار شد که نتایج مشابه بود.

شرح تغییرات مشاهده شده در مورفولوژی در گروه‌های کنترل و تیمار بعد از رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت هوخست، هسته‌ها به رنگ آبی در آمدند و با کمک این رنگ‌آمیزی تغییرات مورفولوژیک رخ داده در هسته‌ها به‌صورت تراکم و شکستگی مشاهده شد.

بحث

بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از دو آزمون رنگ آمیزی با تریپان بلو و MTT نشان داد که عصاره آبی وتاکسول موجب کاهش چشمگیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند. گرچه عصاره الکلی نیز توانست سلول‌های سرطانی را از بین ببرد، اما اثرات سایتوتوکسیک (سمیت سلولی)آن نسبت به تاکسول و عصاره آبی ناچیزتر است. نتایج به‌دست آمده از هر دو آزمون در یک راستا بوده و یکدیگر را تایید کردند.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی همزمان هوخست و پروپیدیوم آیوداید نشان داد که در مقابل سلول‌های زنده با هسته‌های آبی رنگ هسته سلول‌های مرده قرمز رنگ شده‌اند و در گروه تیمار با عصاره‌های الکلی، آبی (فاقد عوامل غیرقطبی) و تاکسول هسته‌های آبی رنگ بسیار کم بودند.

رنگ آمیزی آکریدین اورنژ تغییرات رخ داده در سیتوپلاسم و موقعیت هسته و سیتوپلاسم را نسبت به هم نشان داد.

سایر مطالعاتی که پیش از این در رابطه با اثرات سایتوتوکسیک تاکسول و عصاره مریم گلی الکلی و آبی صورت گرفته توانایی این ترکیبات را در کاهش توانایی زیستی سلول‌های سرطانی را نشان داده‌اند. تحقیقات متعددی که در مورد اثرات سایتو توکسیک تاکسول در دو محیط in vivo و in vitro انجام شده است، سمیت آن را روی سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند. درسال ۱۹۹۳ گروهی به سرپرستی Liebmann اثر تاکسول (دوزهای ۲ تا ۲۰ نانومولار) را روی چندین رده سلول سرطانی از جمله MCF-7، HeLa، A549، U373، HT-29، OVG-1، PC-Sh و PC-Zd سنجیده و به این نتیجه رسیدند که IC50 تاکسول بسته به نوع سلول، بین ۲/۵ تا ۷/۵ نانومول بر لیتر متغیر است و با افزایش زمان تیمار از ٢٤ به ٧٢ ساعت، سایتوتوکسیسیتی تاکسول در انواع مختلف سلول‌ها بین ۵ تا ۲۰۰ برابر افزایش می‌یابد [۲۷]. در سال ۲۰۰٤ بررسی اثرات کشندگی تاکسول روی رده‌های سلولی KTC-2، KTC-3، ARO و FRO نشان داد که اثرات تاکسول در این سلول‌ها وابسته به دوز بوده و بسته به دوز مصرفی ممکن است مکانیسم‌های مختلفی را شامل شود برای مثال تاکسول در محدوده دوز ٦ تا ۵۰ نانومول بر لیتر موجب القای تغییرات مشخصه آپپتوزیس از جمله شکافت Poly (ADP-ribose) polymerase و پروکاسپاز و تغییر در تقارن غشا شده و در غلظت‌های بالاتر سایر اشکال مرگ سلولی (احتمالا ناشی از فروپاشی میتوکندریایی) را القا می‌کند [۳۱].

تجزیه شیمیایی عصاره الکلی مریم گلی نشان داده که این عصاره غنی از فلاونوئیدهای مختلف و ترکیبات فنلی می‌باشد. مهم‌ترین فلاونوئیدهای موجود در مریم گلی آپیژنین (محلول در الکل) و لوتئولین (محلول در آب) می‌باشند[۳۳]. علاوه بر این عصاره

مریم گلی حاوی ترکیبات مختلف دیگری مانند استروئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، فنل‌ها و پلی پپتیدهای مختلفی است که از این میان اورسولیک اسید (Ursolic acid)، کارنوسول (Carnosol)، رزمارینیک اسید (Rosmarinic acid) و کارنوسیک اسید (Carnosic acid) نسبت به سایر ترکیبات شناخته شده‌تر بوده و تحقیقات بیشتری در مورد خواص ضدسرطانی آنها صورت گرفته است[۲٤].

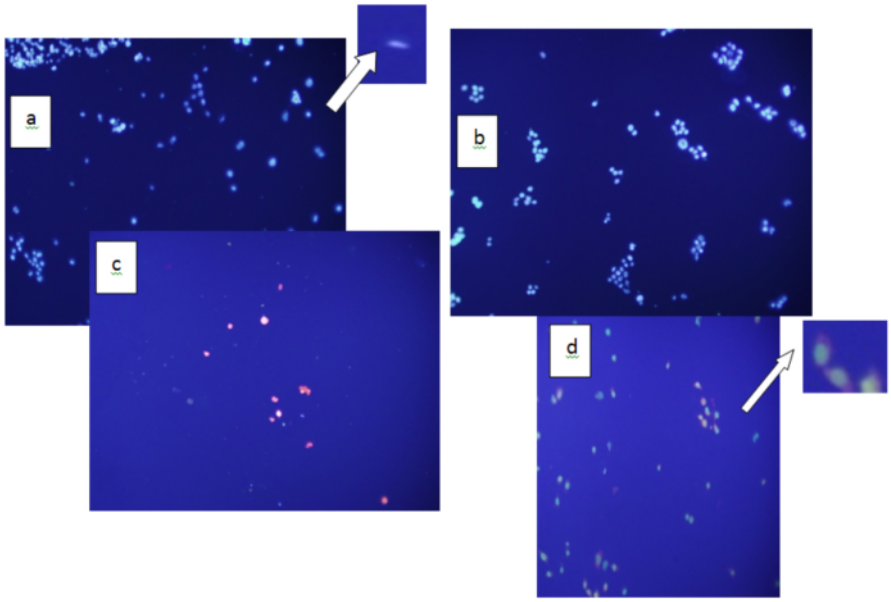
همان‌طور که گفته شد عصاره مریم گلی غنی از ترکیبات فلاونوئیدی همانند لوتئولین بوده و بخشی از خواص ضد سرطانی آن نیز ناشی از وجود همین ترکیبات می‌باشد. Kawaii و همکاران در سال ۱۹۹۹ اثرات ضد تکثیری ۲۷ فلاونوئید مختلف را روی چندین رده سلولی نرمال و سرطانی از جمله A549، B16 melanoma، 4A5، CCRF-HSB-2 و TGBC11TKB آزمودند و نتیجه گرفتند که از بین همه آنها لوتئولین قوی‌ترین اثر مهاری و کم‌ترین IC50 را نسبت به سایر فلاونوئیدها داشته و IC50 محاسبه شده برای آن در رده‌های سلولی مختلف بین ۱/۳ تا ۳/۱ میکرومول بر لیتر متفاوت است[۲۳]. مطالعه مشابهی که در مورد اثر لوتئولین روی رده سلولی سرطان کبد HepG2 انجام گرفت مشخص نمود که لوتئولین قادر است در سلول‌های سرطانی آپپتوزیس القا کند[۲۵]. اخیرا نیز گروهی به سرپرستی Yang اثرات ضد توموری و ضد تکثیری لوتئولین را روی رده سلولی SCC-4 بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که تیمار سلول‌های سرطانی با لوتئولین موجب توقف سلول‌ها در فاز G1 چرخه سلولی شده و متعاقب آن موجب القاء آپوپتوزیس در این سلول‌ها می‌گردد [۳۵]. یکی دیگر از ترکیبات مهم موجود در عصاره برگ‌های گیاه مریم گلی آپیژنین می‌باشد که اثرات ضد سرطان و ضدتومور آن در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است. در سال ۲۰۰۰ Wang و همکاران اثر آپیژنین (محدوده دوز ۸۰-۰ میکرومول بر لیتر) را بر رشد و چرخه سلولی رده‌های سلولی کارسینومای کلون انسانیSW480، Caco-2وHT-29 سنجیده و نتیجه گرفتند که تیمار سلول‌ها با آن موجب یک کاهش وابسته به دوز هم در تعداد و هم در محتوای پروتئینی سلول‌ها می‌شود، علاوه بر این تیمار با آپیژنین موجب توقف سلول‌ها در فاز G2/M چرخه سلولی (به‌صورت وابسته به دوز و زمان) و القا مرگ سلولی در آنها می‌گردد[۳٤].

تحقیقاتی که در طی سال‌های اخیر در مورد مکانیسم‌های سرطان‌زایی صورت گرفته نشان داده است که κB–NF (نوعی فاکتور نسخه‌برداری که در صورت تحریک شدن توسط محرک‌هایی مانند کارسینوژن‌ها، عوامل التهابی، پیش‌برهای تومور، رادیکال‌های آزاد و اندوتوکسین‌ها، فعال شده و به هسته نقل مکان می‌کند و موجب فعال شدن رونویسی از ژن‌های هدف می‌شوند) و اکثر ژن‌هایی که به واسطه NF-κB فعال می‌شوند نقشی حیاتی در مراحل اولیه و پیشرفته بسیاری از سرطان‌های مهاجم ایفا می‌کنند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به سیکلین D1 و ژن‌های کدکننده پروتئین‌های سرکوب‌کننده آپپتوزیس مانندIAP، Survivin، bcl-2 و bcl-Xl و ژن‌هایی که در متاستاز و رگزایی نقش دارند اشاره نمود که به واسطهNF-κB افزایش بیان می‌یابند [۱۳]. نتیجه تحقیقی که در سال ۲۰۰۱ انجام شد نشان داد که فلاونوئیدهایی همانند رزمارینیک اسیدموجود در گیاهانی از قبیل مریم گلی قادرند با فعال کردن PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) بیان COX-2 را مهار نمایند و

سلول‌های سرطانی را از بین برند[۲۶]. تاکنون اثرات مهارکنندگی رشد اورسولیک اسیدروی رده‌های سلولی مختلفی از جمله HepG2، Caco-2، SNGII [۱۵]، MCF-7 [۱۵، ۲۰]، B16 [۲۱]، HT-29 [۹]، HL-60 [۱۱] و B16F-10 [۲۸] وM4Beu4 [۱۹]، آزموده شده و به اثبات رسیده است.

نتایج به دستامده در پژوهش حاضر نیز بیانگر سایتوتکسیسیتی تاکسول و عصاره‌های آبی و الکلی مریم گلی بر رده سلول‌های سرطانی 4T1 موش بوده و با نتایج گزارش شده درمطالعات مشابه قبلی همراستا می‌باشد. علاوه بر این بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها نشان داد که در سلول‌های تیمار شده توسط تاکسول و عصاره‌های آبی و الکلی تغییراتی همانند فروپاشی هسته‌ای و تشکیل اجسام آپپتوتیک و حباب زدگی غشا مشاهده شده است که وجود این تغییرات مورفولوژیک یکی از پیامدهای رخداد آپپتوزیس در سلول‌ها می‌باشد، البته لازم به ذکر است که صرفا با اتکا به این نتایج نمی‌توان وقوع آپپتوزیس در سلول‌ها را به اثبات رساند و برای اثبات این امر انجام تست‌های اختصاصی از قبیل الکتروفورز ژل آگارز (جهت تشخیص DNA Fragmentation) تست TUNEL و بررسی مارکرهای آپپتوتیک توسط تکنیک فلوسایتومتری نیاز است.

در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که ترکیبات موثر موجود در عصاره آبی مریم گلی (عمدتا لوتئولین و رزمارینیک اسید) و نیز ترکیبات موجود در عصاره الکلی این گیاه (از قبیل آپیژنین، اورسولیک اسید، رزمانول، کارنوسول و کارنوسیک اسید) مسئول القا مرگ سلولی (احتمالا از نوع آپپتوزیس)در سلول‌های سرطانی 4T1 بوده و می‌بایست خواص ضد سرطانی و سایتوتوکسیک این عصاره‌ها را ناشی از وجود چنین ترکیباتی در این عصاره‌ها دانست.



شکل ۱)رنگ آمیزی فلورسنس سلول‌های 4T1 تیمارشده باتاکسول، عصاره آبی و عصاره الکلی در مدت ۲۴ ساعت با استفاده از رنگ فلورسنت هوخست، پروپیدیوم آیوداید و آکریدین اورنژ که نشان‌دهنده تغییر شکل و تراکم هسته‌ها و تغییرات سیتوپلاسم است.

a) گروه کنترل b) رنگ آمیزی هوخست (تاکسول ۵ نانومول بر لیتر) c) فلورسنت پروپیدیوم آیوداید و هوخست، که افزایش تخریب غشاء و مرگ سلول‌ها و همچنین سلول‌های زنده آبی وسلول‌های مرده قرمز را نشان می‌دهد. (آبی ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر).

d) فلورسنت آکریدین اورنژ، که چروکیدگی سیتوپلاسم سلول‌ها را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. (الکلی ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

منابع:

[۱] امیری، ح، ۱۳٦۸، شناسایی مواد تشکیل‌دهنده روغن اسانس گیاه Salvia bracteata Bank et Sol، مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، (JSIAU)، شماره ٦٦.

[۲] پالیزوان، م، خادمی، ش، ۱۳۸٦، روش‌های کار با موش آزمایشگاهی (رات)و دانشگاه علوم پزشکی اراک.

[۳] عیدی، ا، عیدی، م، ۱۳۸۷، بررسی اثر ضد دردی اسانس برگ گیاه مریم‌گلی Salvia Officinalic L با استفاده از آزمایش فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی، فصلنامه گیاهان دارویی، سال هفتم، دوره چهارم.

[٤] قاسمی‌دهکردی، ن، سجادی، س، ا، قنادی، ع، امن‌زاده، ی، آزا بخت، م، اصغری، غ، امین، غ، حاجی‌آخوندی، ع، مطلب، ا، م، ۱۳۸۲، فارماکوپه گیاهی ایران، دوره ششم، شماره دوم.

[٥] کشاورز، ب، ۱۳۸۹، مریم‌گلی را بیشتر بشناسیم، دانستنی‌های غذا و دارو، معاونت غذا و دارو- مدیریت تحقیق و توسعه، سال چهارم، شماره بیستم.

[٦] گوهری، ا، ح، سعیدنیا، س، گوهری، م، ر، مرادی، ف، مالیمر، م، یزدان‌پناه، م، حاجی‌آخوندی، ع، ۱۳۸٦، بررسی اثرات سیتوتوکسیک برخی از گیاهان دارویی از تیره‌های نعنائیان، کاسنی، گل سرخ و گل گاوزبان بر لارو آرتمیاسالینا.

[۷] نوری‌دلویی، م، ر، ۱۳۸۸، ژنتیک ملکولی پزشکی در هزاره سوم، تهران، سامر، نشر آخر.

[8] 4T1 Metastatic Breast Cancer Model, available From: URL: http: //www2. healthsci. tufts. edu

[9] Andersson, D, Liu, JJ, Nilsson, A, Duan, RD, 2003, Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase, Anticancer Res, 23: 3317–3322.

[10] BALB/c, available From: URL: http: //en. wikipedia. org.

[11] Baek, JH, Lue, YS, Kang, CM, Kim, JA, Kwon, KS, Son, HC, Kim, KW, 1997, Intracellular Ca2+ release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells, Int J Cancer, 73: 725–728.

[12] Baum, M. , Saunders, C. , Meredit, Sh. , translate by Ghaemmaghami, F, 1998, Breast cancer Aguide for everywoman, Boshra press, 12: 15.

[13] Bharti, A. C., Aggarwal, B. B., 2002, Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy, Biochem Pharmacol, 64 (5-6): 883-8.

[14] Center for Disease Control & Prevention, No communicable Deputy, Cancer Office, 2006-2007, Iranian Annual of National Cancer registration Report.

[15] Chen, G. Q., Shen, Y., Duan, H., 2008, Anti-tumor effect and its mechanisms of ursolic acid on human esophageal carcinoma cell Eca-109 in vivo, Chinese Journal of Cancer Research, 20 (3): 205-210.

[16] Cotran, Kumar, COLLIN, 1999, PATHOLOGIC Basis of Disease, 6th Philadelphia WB saunders company, pp: 271-276, 1093-1119.

[17] Craig, w. j., 1999, Health promoting properties of common herbs, American journal of clinical nutrition, 70 (3): 491-499.

[18] Developmental Biology, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University

[19] Duval, R. E., Harmand, P.O. , Jayat-Vignoles, C., Cook-Moreau, J., Pinon, A., Delage, C., Simon, A., 2008, Differential involvement of mitochondria during ursolic-acid induced apoptotic process in HaCaT and M4Beu cells, Oncol Rep 19: 145–149.

[20] Es-saady, D., Simon, A., Jayat-Vignoles, C., Chulia, A. J., Delage, C., MCF-7, 1996a, cell cycle arrestedat G1 through ursolic acid and increased reduction of

tetrazolium salts, Anticancer Res, 16: 481–486.

[21] Es-saady, D., Simon, A., Ollier, M., Maurizis, J. C., Chulia, A. J., Delage, C., 1996b, Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest, Cancer Lett, 106: 193–197.

[22] 22- Grzegorczyk, I., Bilchowski, I., Mikiciuk-Olasik, E., Wysokinska, H., 2004, In vitro cultures of salvia officinalis L. as a source of antioxidant compounds, Medical University oF Łódz/ Muszyn/skiego 1, 90-151, oF Łódz/, Poland.

[23] 23- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., 1999, Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines, Biosci Biotechnol Biochem; 63 (5): 896-9.

[24] 24- Keshavarz, M., Mostafaie, A. , 2010, In Vitro and Ex Vivo Antiangiogenic Activity off Salvia officinalis, Published online in Wiley InterScience.

[25] Lee, H. J., Wang, C. J., Kuo, H. C., Chou, F. P., Jean, L. F., Tseng, T. H., 2005, Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK, Toxicol Appl Pharmacol; 1; 203 (2): 124-31.

[26] Liang, Y. C., Tsai, S. H., Tsai, D. C., Lin-Shiau, S. Y., 2001, Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages, FEBS Letters, 496 (1): 12–8.

[27] Liberman, M., lebovitz, R., translate by Tofani Nezhad, K., 1998, Neoplasia,. Anderson, s Pathology Chap. 24, Damineh press.

[28] Manu, K. A., Kuttan, G., 2008 Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF-kB mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells, Int Immunopharmacol 8: 974–981.

[29] 29- Ompson & Thompson, translate by GhofranI, M. , Habibi, L., 2009, Genetics in Medicine, For Tomorrow press.

[30] Perry, K., change, C., 2007, Quality of life assessment in women with breast cancer, Health and Quality of life outcomes 5 (24) 1-14.

[31] Pushkarev, V. M., Starenki, D. V., Saenko, V. A., Namba, H., Kurebayashi, J., Tronko, D., Yamashita, S., 2004, Molecular Mechanisms of the Effects of Low Concentrations of Taxol in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. Cancer; 145 (7): 3143.

[32] VanZvtfn , A. L., F. , M., Bayvmnz, V., Abedin Darkush, F., Jafari, N., Jalal, m., 2008, Principles of Laboratory Animal Science, Center for Academic Publishing.

[33] Velicovic, D., Nikolova, M., Ivancheva, S. V., Stojanovic, J. B., Veljkovic, V. B. 2007, Extraion of flavonoids from garden (L.) and glutinous (L.) sage by ultrasonic and classical maceration. J. Serb. Chem. Soc, 72 (1): 73–80.

[34] Wang, W., Heideman, L., Chung, C. S., Pelling, J. C., Koehler, K. J., Birt, D. F 2000, Cell-Cycle Arrest at G2/M and Growth Inhibition by Apigenin in Human Colon Carcinoma Cell Lines, Molecular Carcinogenesis; 28 (2): 102–110.

[35] Yang, S. F., Yang, W. E., Chang, H. R., Chu, S. C., Hsieh, Y. S., 2008, Luteolin Induces Apoptosis in Oral Squamous Cancer Cells, JDR, 87 (4): 401-406.

[36] Zargari, A., 1997, Medicinal Plant, Vol4, Tehran University press, Study of cytotoxic effects of alcoholic extract of salvia officinalis onThe 4T1 cell line derived from mouse mammary tumors in BALB/ c. 59: 64.